

# **Immunrekonstitution nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation im Kindesalter**

---

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Marie-Luise Pietschmann  
geboren am 07.12.1984  
in Bautzen

## Gutachter

1. PD Dr. med. Bernd Gruhn; Klinik für Kinder- und Jugendmedizin; Universitätsklinikum Jena
2. PD Dr. med. habil. Sebastian Scholl; Klinik und Poliklinik für Innere Medizin; Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. med. Daniel Steinbach; Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.12.2012

Meinen Eltern und Großeltern.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ARAC	Cytosin-Arabinosid
ATG	Antithymozytenglobulin
BCNU	Carmustin
BFU <sub>E</sub>	burst forming unit, erythroid
BM	bone marrow
BU	Busulfan
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAM	Campath
CBPT	Carboplatin
CD	cluster of differentiation
CFU	colony forming unit
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalie-Virus
CY	Cyclophosphamid
d.h.	das heißt
E	erythroid
EBV	Epstein-Barr-Virus
Eo	eosinophil
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englisch
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLU	Fludarabin
fTBI	fraktionierte Ganzkörperbestrahlung (engl. fractionated total body irradiation)
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GEMM	gemischt granulozytär, erythroid, monozytär, megakaryozytär
GM	granulozytär, monozytär
griech.	griechisch

GvHD	Graft-versus-Host-Disease
GvL	Graft-versus-Leukemia Effekt
GvT	Graft-versus-Tumor Effekt
Hb	Hämoglobin
HLA	human leucocyte antigen
HSCT	haematopoietic stem cell transplantation
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
Meg	megakaryozytär
MEL	Melphalan
MHC	major histocompatibility complex
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
o.g.	oben genannt
PBSC	peripheral blood stem cells
PBSZ	periphere Blutstammzellen
PC5	Phycoerythrin-Cyanin-5
PE	Phycoerythrin
PP	Polypropylen
sog.	so genannt
SZ	Stammzellen
SZT	Stammzelltransplantation
Tab.	Tabelle
TBI	Ganzkörperbestrahlung (engl. total body irradiation)
TEPA	Thiotepa
URB	Urbason
vgl.	vergleiche
VOD	Veno-occlusive-Disease
VP16	Vepesid
VZV	Varizella-Zoster-Virus
z.B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1	Abstract	3
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1	Grundzüge der Hämatopoese und des lymphatischen Systems	5
2.2	Hämatopoetische Stammzelltransplantation	7
2.2.1	HLA-System	8
2.2.2	Ablauf der hämatopoetischen Stammzelltransplantation	10
2.2.3	Komplikationen	12
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>Patienten, Materialien und Methoden</b>	<b>16</b>
4.1	Patienten	16
4.2	Materialien	20
4.2.1	Antikörper	20
4.2.2	Reagenzien und Geräte	21
4.3	Methoden	22
4.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	22
4.3.2	Durchführung	23
4.3.3	Statistische Methoden	23
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
5.1	Vergleich KM und PBSZ	26
5.2	Vergleich autologe und allogene Transplantation	32
5.3	Vergleich CD34+ selektionierte und unselektionierte PBSZ	38
5.4	Vergleich KM mit und ohne Konditionierung durch ATG	46
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
6.1	Inhaltliche Diskussion	52
6.1.1	Einfluss der Stammzellquelle	53
6.1.2	Einfluss der Transplantationsart	55
6.1.3	Einfluss der CD34+ Selektionierung	58
6.1.4	Einfluss der Konditionierung mit ATG	61
6.2	Methodische Diskussion	63
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>

<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>72</b>
9.1	Tabellenverzeichnis	72
9.2	Abbildungsverzeichnis	73
9.3	Curriculum vitae	76
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	77
9.5	Danksagung	78

# 1 Zusammenfassung

Seit den Anfängen ihrer Anwendung in den 1960er Jahren ist die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) dank ausgiebiger Forschungen heutzutage weltweit etablierter Teil der Therapie für eine Reihe von hämatologischen, onkologischen und immunologischen Erkrankungen.

Dennoch sind Komplikationen wie Transplantatversagen, Graft-versus-Host-Disease (GvHD) oder schwerwiegende Infektionen nach wie vor therapielimitierende Faktoren.

Um den Ablauf der Immunrekonstitution nach HSZT besser verstehen zu können, untersucht die vorliegende Arbeit verschiedene Einflussfaktoren der Transplantation hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Immunrekonstitution.

Mit diesem Ziel wurden die Daten von insgesamt 80 Patienten, die in den Jahren 1998 bis 2006 an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der FSU Jena eine Stammzelltransplantation erhielten, ausgewertet und die absoluten Zellzahlen an sieben Messzeitpunkten über einen Zeitraum bis 2 Jahre nach HSZT bestimmt. Dabei wurden mittels Durchflusszytometrie die Zellpopulationen der B-, T-, T-Helfer-, naiven und memory TH-, zytotoxischen T- und NK-Zellen sowie die T-Zell-Ratio gemessen.

Trotz gegensätzlicher Ergebnisse in Studien mit erwachsenen Patienten hat die Stammzellquelle (Knochenmark (KM) oder periphere Blutstammzellen (PBSZ)) keinen signifikanten Einfluss auf die Immunrekonstitution im Kindesalter.

Im Rahmen der autologen Transplantation war die Rekonstitution von CD4+ T-Helferzellen und naiven TH-Zellen signifikant schneller als in der allogenen Gruppe. Das fehlende Risiko einer GvHD und nachfolgender Immunsuppression könnte der Grund für dieses Ergebnis sein. Die Immunrekonstitution der NK- und zytotoxischen T-Zellen zeigte dagegen bei der allogenen HSZT einen signifikanten Vorteil gegenüber der autologen Transplantation.

Durch die CD34+ Selektionierung war die Rekonstitution der T-Zellen und deren Subpopulationen (T-Helfer, naive und memory TH- und zytotoxische T- Zellen) signifikant verzögert. Grund für diesen verzögernden Effekt auf die Immunrekonstitution könnte die umfassende T-Zell-Depletion durch die CD34+ Selektionierung sein.



Die Anwendung von Antithymozytenglobulin (ATG) im Rahmen der Konditionierung war gefolgt von einer signifikant langsameren Rekonstitution innerhalb der naiven T-Helferzellen und der T-Zell-Ratio sowie einer insignifikanten Verzögerung der CD4+ T-Helferzell-Rekonstitution.

Es bleibt Aufgabe zukünftiger Studien, die hier gefundenen Ergebnisse auf ihre klinischen Auswirkungen im Bezug auf die Inzidenz von GvHD oder Infektionsraten auszuweiten.

## 1.1 Abstract

Since the beginning of its use in the 1960s, haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has become a globally established therapy for the cure of a variety of diseases, ranging from haematological to oncological and immunological disorders.

Despite continuous research in the field, complications like graft failure, graft-versus-host disease (GvHD) or severe infections are still limiting therapy success.

To gain a better understanding of the mechanisms of immune reconstitution after HSCT, this study compares different factors of transplantation with regard to their effect on immune reconstitution.

For that purpose, data of a total of 80 patients undergoing HSCT in the years from 1998 to 2006 at Klinik für Kinder- und Jugendmedizin of FSU Jena has been analysed by measuring total lymphocyte counts at days 30, 60, 100, 180, 360, 540 and 720 after HSCT via flow cytometry. Lymphocyte subpopulations included B-, T-, T-helper, naive and memory T-helper-, cytotoxic T- and NK-cells. T-cell-ratio was calculated as well.

Despite contrary findings in studies with adult patients, use of bone marrow (BM) or peripheral blood stem cells (PBSC) had no significant effect on immune reconstitution in childhood.

In autologous transplantation, reconstitution of CD4+ T-helper cells and naive TH-cells was significantly faster than in the allogeneic group. Lacking risk of GvHD and following immunosuppressive therapy in the autologous setting might be the reason for this finding. By contrast, NK- and CD8+ cytotoxic T-cells developed earlier after allogeneic transplantation.

Due to CD34+ selection, reconstitution of T-cells and their subpopulations (T-helper-, naive and memory T-helper- and cytotoxic T-cells) was significantly delayed. The reason for this impact on immune reconstitution might be the profound T-cell-depletion through CD34+ selection.

The application of anti-thymocyte globulin (ATG) in the conditioning regime was followed by a significantly slower reconstitution of naive T-helper cells and T-cell-ratio together with an insignificant delay in CD4+ T-helper-cell reconstitution.

It remains the task of future studies to explore the clinical impact of these findings in respect of incidence of GvHD or infection rates.

## 2 Einleitung

Die Ursprünge der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) liegen in Forschungen zur Behandlung von Strahlenfolgen in den 1950er Jahren. Damals konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Mäuse nach tödlicher Strahlenexposition überleben konnten, wenn ihnen nach der Exposition Knochenmark (KM) transplantiert wurde (Lorenz et al. 1952).

1968 gelang die weltweit erste erfolgreiche allogene Knochenmarktransplantation (KMT) am Menschen, ein 5 Monate altes Kind mit schwerem angeborenem Immundefekt erhielt HLA-kompatibles KM von seinem Geschwister (Gatti et al. 1968). In den darauf folgenden Jahren fand die Stammzelltransplantation (SZT) eine immer breitere Anwendung, oftmals verbunden mit hohen Komplikationsraten und damit nicht immer erfolgreich hinsichtlich einer Heilung oder zumindest Verbesserung des klinischen Verlaufs der Patienten.

Heutzutage ist die HSZT dank ausführlicher und andauernder Forschung nicht länger Ultima Ratio bei therapierefraktären Verläufen, sondern fester Bestandteil moderner Therapieschemata (Bartsch 1996).

Von entscheidender Bedeutung für den klinischen Verlauf und die Prognose der Patienten ist dabei neben den Komplikationen auch die sog. Immunrekonstitution, also die Wiederherstellung des Immunsystems nach der SZT.

Zum besseren Verständnis der Immunrekonstitution nach HSZT folgen im Weiteren Erläuterungen zu den Grundzügen der Hämatopoese sowie der HSZT, deren Ablauf und Komplikationen.

## 2.1 Grundzüge der Hämatopoese und des lymphatischen Systems

Gemeinsamer Startpunkt aller Zellreihen der Hämatopoese ist die pluripotente Stammzelle. Sie trägt auf ihrer Oberfläche den charakteristischen immunologischen Marker CD34 (CD = cluster of differentiation). Abhängig von verschiedenen Wachstumsfaktoren kann diese Stammzelle sich weiter in die erythropoetischen, thrombopoetischen und lymphopoetischen Zelllinien differenzieren (s. Abb. 1). Neben der Fähigkeit zur Differenzierung kann die pluripotente Stammzelle sich ebenso selbst erneuern und so für ein konstantes Gleichgewicht in der Hämatopoese sorgen (Hoffbrand et al. 2003).

Ein für die HSZT besonders wichtiger Wachstumsfaktor ist der sog. granulocyte colony-stimulating factor, kurz G-CSF, der zum einen die Neutrophilenproduktion aktiviert, zum anderen jedoch vor allem die Stammzellen mobilisiert und somit in der Vorbereitung auf die Stammzelltransplantation eine große Rolle spielt (Kiefel et al. 2010).

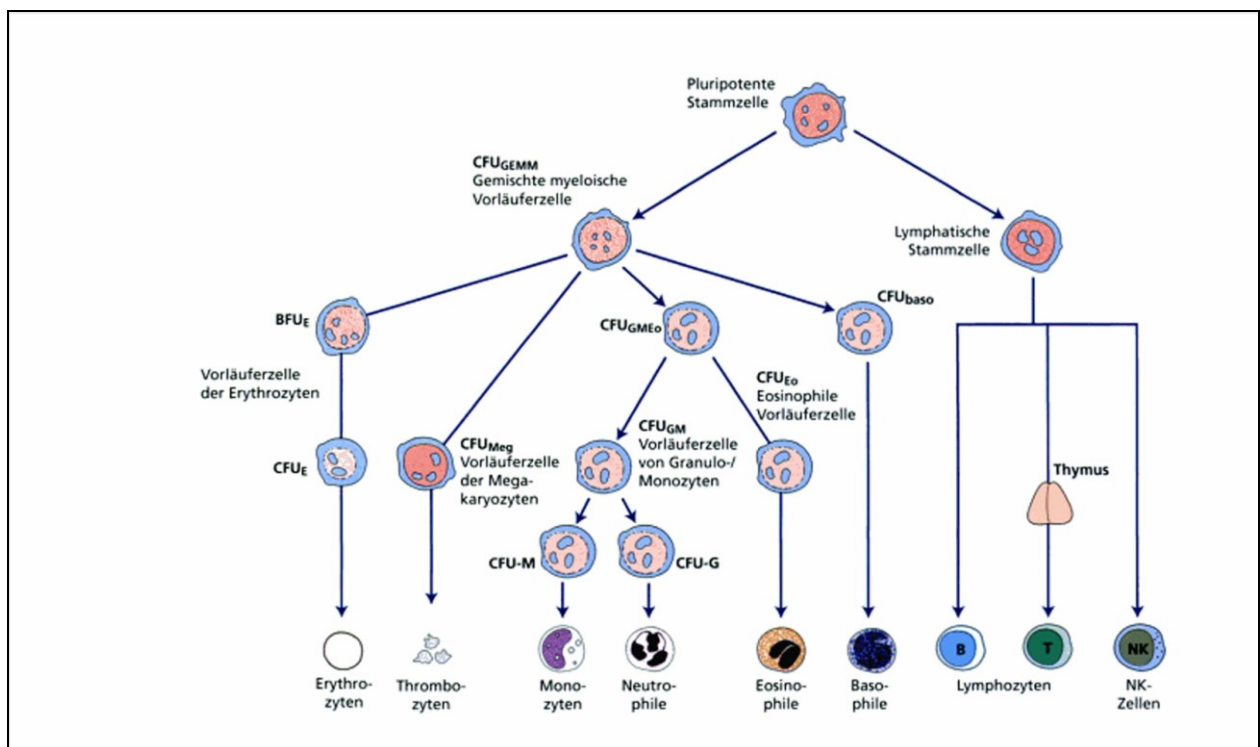


Abbildung 1: Schematische Übersicht über die Hämatopoese. Vergleiche Hoffbrand et al. 2003.

BFU<sub>E</sub> = „burst forming unit“, erythroid; CFU = colony forming unit; E = erythroid; Eo = eosinophil; GEMM = gemischt granulozytär, erythroid, monozytär, megakaryozytär; GM = granulozytär, monozytär; Meg = megakaryozytär; NK = natürliche Killer(zellen).

Die Zellen des lymphatischen Systems, also der spezifischen Immunabwehr, sind für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse.

Ausgehend von der lymphoiden Vorläuferzelle entwickeln sich im weiteren Verlauf T-,B- und NK-Zellen. Dabei bleiben die B-Zellen während ihrer Entwicklung im Knochenmark, die T-Zellen hingegen wandern in den Thymus, um dort weiter zu reifen.

Eine Übersicht über die verschiedenen, für diese Arbeit relevanten, Zellpopulationen und ihre Funktion sowie ihre CD-Merkmale gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über die relevanten Zellpopulationen des lymphatischen Systems. Vergleiche Schütt et al. 2011, Ganten et al. 2004.

<b>Zellpopulation</b>	<b>CD-Merkmale</b>	<b>Funktion</b>
B-Zellen	CD19+	B-Zellrezeptoren sind membranverankerte Antikörper, bei Aktivierung Differenzierung in sog. Plasmazellen, die die entsprechenden Antikörper sezernieren (= humorale Immunantwort)
T-Zellen	CD3+	Modulierung der humoralen Immunantwort, je nach Subpopulation Aktivierung oder Hemmung von T- und B-Zellen bzw. direkte Zytotoxizität (s.u.)
TH-Zellen (T-Helfer-Zellen)	CD3+ CD4+	Aktivierung von weiteren T-Zellen und B-Zellen mithilfe von Zytokinen
naive TH-Zellen	CD45RA+ CD4+	TH-Zellen ohne Antigenkontakt, unspezifische Aktivierung von T- und B-Zellen mithilfe von Zytokinen
memory TH-Zellen	CD45RO+ CD4+	TH-Zellen nach Antigenkontakt, spezifische Aktivierung von B-Zellen mithilfe von Zytokinen
zytotoxische T-Zellen	CD3+ CD8+	direkte Lyse von infizierten Zellen mithilfe von Perforinen und Granzymen
NK-Zellen (natürliche Killerzellen)	CD3- CD16/CD56+	direkte Lyse von infizierten oder entarteten Zellen mithilfe von Perforinen und Granzymen

## 2.2 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die HSZT ist eine klinische Behandlungsmethode für eine Reihe hämatologischer, onkologischer und genetischer Erkrankungen. Ziel ist der Ersatz maligne veränderter, kranker oder fehlender Zellen durch gesunde Spenderzellen (Gadner et al. 2006). Diese Spenderzellen können dabei sowohl von einer anderen Person, als auch vom Patienten selbst stammen. Eine Transplantation von einer andere Person wird somit als allogene (griech.: anderswo entstanden) Transplantation bezeichnet, eine solche durch Eigenspende als autologe (griech.: im gleichen Körper entstanden) Transplantation.

Die allogene SZT spielt vor allem in der Hämatoonkologie eine Rolle, wo das maligne entartete hämatopoetische System des Empfängers vollständig durch die gesunden Stammzellen des Spenders ersetzt wird. Zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen ist hierbei die strenge Auswahl eines kompatiblen Spenders äußerst wichtig (s. Kap. 2.2.1 HLA-System). Indikationen sind vor allem akute Leukämien sowie angeborene Immundefekte und genetische Erkrankungen.

Demgegenüber kommt die autologe SZT vermehrt im Rahmen onkologischer Grunderkrankungen mit oftmals soliden Tumoren, wie z.B. Neuroblastom, Medulloblastom oder Non-Hodgkin-Lymphom, zum Einsatz, wo nach Hochdosis-Chemotherapie das eigene hämatopoetische System des Patienten möglichst schnell wieder rekonstituiert werden soll (Gadner et al. 2006).

Eine dritte Form der SZT ist die sog. syngene Transplantation, d.h. die Verwendung von Stammzellen eines eineiigen Zwillings, was in der Praxis äußerst selten ist.

Neben verschiedenen Arten des Spenders gibt es auch verschiedene Stammzellquellen, die bei der HSZT zum Einsatz kommen.

Historisch gesehen die erste von drei Möglichkeiten ist die KMT, bei welcher direkt KM des Spenders aspiriert und nachfolgend transplantiert wird.

Nach Stimulierung durch den sog. granulocyte colony-stimulating factor, kurz G-CSF, können die hämatopoetischen Stammzellen jedoch auch aus dem peripheren Blut mobilisiert werden, konsequenterweise werden diese dann als periphere Blutstammzellen (PBSZ) bezeichnet.

Eine dritte Möglichkeit der Stammzellgewinnung ist diejenige aus Umbilikalvenenblut (Wagner et al. 2010).

Je nach Stammzellquelle sind verschiedene Dosen an nukleären Zellen zur Transplantation notwendig (s. Tab. 2).

Tabelle 2: Übersicht über die nötige Dosis der verschiedenen Stammzellquellen. Vergleiche Hiddemann et al., 2009, Kiefel et al. 2010.

<b>Stammzellquelle</b>	<b>Dosis</b>
Knochenmark	$2-3 \times 10^8$ nukleäre Zellen/kg KG
periphere Blutstammzellen	$4-5 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg KG
Umbilikalvenenblut	$2-3 \times 10^7$ nukleäre Zellen/kg KG

### 2.2.1 HLA-System

Von entscheidender Bedeutung für die Verträglichkeit der SZT ist das sog. HLA-System (HLA = human leukocyte antigen), oder auch major histocompatibility complex, kurz MHC, genannt.

Diese Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers und haben die Aufgabe, entweder intrazelluläre Proteine oder zuvor phagozytierte extrazelluläre Proteine zu präsentieren. Dabei kann man zwei MHC-Klassen unterscheiden, zum einen MHC-I und zum anderen MHC-II.

MHC-Klasse-I Moleküle kommen auf allen kernhaltigen Zellen vor und präsentieren intrazelluläre Proteine. Dabei interagieren MHC-I mit CD8+ (zytotoxischen) T-Zellen. MHC-Klasse-II Moleküle befinden sich dagegen nur auf Antigen-präsentierenden Zellen, also dendritischen Zellen, B-Zellen und aktivierten Makrophagen. Sie präsentieren extrazelluläre Proteine als Antigene den CD4+ T-Zellen (T-Helferzellen). Mithilfe der MHC-Moleküle ist es somit dem Körper möglich, körpereigen und körperfremd zu unterscheiden sowie die spezifische Immunabwehr exakt auf die jeweiligen Antigene abzustimmen.

Das HLA-System ist gekennzeichnet durch einen ausgeprägten genetischen Polymorphismus. Insgesamt sind für die beiden MHC-Klassen sechs Genloci mit jeweils hunderten möglichen Allelen bekannt (s. Tab. 3). Alle Loci befinden sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (s. Abb. 2) und werden häufig in Kombination

vererbt, sodass zwei Verwandte mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:5 identische HLA-Antigene haben (Hoffbrand et al. 2003).

Bei allogener SZT besteht dann eine HLA-Kompatibilität, wenn die HLA-Merkmale von Spender und Empfänger hinsichtlich der Loci HLA-A, B, C, DRB1 und DQB1 übereinstimmen. Diese 5 Loci haben somit insgesamt 10 mögliche Allele (jeweils eines von Vater und Mutter), die übereinstimmen müssen, wobei auch eine Übereinstimmung von 9 Allelen akzeptabel ist (Speer et al. 2009; Loiseau et al. 2007). Lässt sich kein HLA-identischer Spender finden, so kann auch auf sog. haploidentische (d.h. nur zur Hälfte HLA-identische) Stammzellen von einem Elternteil zurückgegriffen werden. Hierbei ist es zwingend notwendig, die Stammzellen vor der Transplantation so rein wie möglich zu selektieren (= CD34+ Selektion), um das Risiko für Abstoßungsreaktionen möglichst gering zu halten (Speer et al. 2009).

Tabelle 3: Übersicht über die Genloci der zwei MHC-Klassen.

MHC-Klasse	Genloci
MHC-Klasse I	HLA-A HLA-B HLA-C
MHC-Klasse II	HLA-DR HLA-DQ HLA-DP

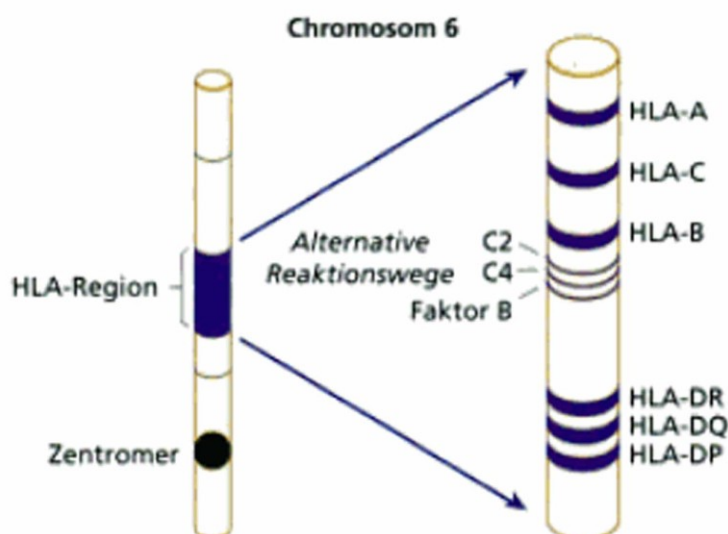


Abbildung 2: Die Genloci des HLA-Komplexes auf Chromosom 6. Vergleiche Hoffbrand et al. 2003.



## **2.2.2 Ablauf der hämatopoetischen Stammzelltransplantation**

Der Ablauf der HSZT lässt sich in vier Abschnitte gliedern (s. Tabelle 4).

Bei der allogenen SZT muss zunächst ein nach den oben beschriebenen Kriterien HLA-kompatibler Spender gefunden werden, bei der autologen SZT müssen die Stammzellen des Patienten selbst entnommen und kryokonserviert werden.

Danach beginnt der erste Abschnitt der HSZT, die Konditionierung.

Ziel ist hierbei zum einen, alle Tumorzellen zu zerstören, zum anderen das Immunsystem des Patienten völlig auszuschalten, um ein Anwachsen des Transplantats zu ermöglichen und Komplikationen wie Abstoßungsreaktionen zu vermeiden.

Die Konditionierung erfolgt mit verschiedenen Kombinationen von Chemotherapeutika und ggf. (fraktionierter) Ganzkörperbestrahlung (= engl. (fractionated) total body irradiation, (f)TBI). Vor allem letztere hat im Kindesalter gravierende Auswirkungen auf Wachstum, Fertilität und alle endokrinen Organe, sodass die Indikation zur TBI streng gestellt werden muss und sie vor allem bei Hochrisikopatienten Verwendung findet (Speer et al. 2009).

Zusätzlich kann ein polyklonaler Antikörper gegen Lymphozyten verabreicht werden, das sog. Anti-Thymozyten-Globulin (ATG). ATG supprimiert alle Lymphozyten und somit das Immunsystem. Auch hier ist die Nebenwirkungsrate mit Infektionen, anaphylaktischen Reaktionen und potraierter Leukopenie sehr hoch, weshalb ATG nach strenger Indikationsstellung vor allem bei Fremdspende oder haploidentischer Familienspende zum Einsatz kommt (Hiddemann et al. 2005).

Der zweite Abschnitt ist die Transplantation selbst. Hierbei werden entweder das entnommene Knochenmark oder die aufbereiteten Stammzellen intravenös infundiert.

Unmittelbar nach der Transplantation folgt der dritte Abschnitt, die Aplasie. Sie ist gekennzeichnet durch das langsame Anwachsen des Transplantates im Empfänger. Dieser Vorgang dauert mehrere Wochen, bei autologer SZT erreicht die Leukozytenzahl erstmals nach ca. 14 Tagen die Grenze von 1000/ $\mu$ l, bei allogener SZT sogar erst nach 3 Wochen. Während dieser Zeit müssen die Patienten streng

isoliert in speziell belüfteten Einzelzimmern betreut werden, da die Gefahr von Infektionen extrem hoch ist (Speer et al. 2009).

Auch nach der Phase der Aplasie ist das Immunsystem des Empfängers lange Zeit noch nicht wieder vollständig rehabilitiert und es bedarf regelmäßiger laborchemischer und molekularbiologischer Untersuchungen zur Therapiekontrolle. Diesen Zeitraum bezeichnet man als Immunrekonstitution, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist. Dabei erholen sich die Komponenten des angeborenen Immunsystems, also die Schleimhautbarriere, die Granulozyten und Makrophagen, innerhalb von Wochen, bei den Zellen des spezifischen Immunsystems wie den B- oder den CD8<sup>+</sup> (zytotoxischen) T-Zellen dauert dieser Prozess mehrere Monate. CD4<sup>+</sup> T-Zellen benötigen sogar mitunter länger als ein Jahr, bis sie wieder die Zahl und Funktionsfähigkeit eines Gesunden erreicht haben (Geddes et al. 2006).

Tabelle 4: Zeitlicher Ablauf der Stammzelltransplantation

<b>Zeitraum</b>	<b>Phase</b>
Tag 7-8 vor HSZT	Konditionierung
Tag 0	Transplantation
bis Tag 14 bzw. 21 nach HSZT	Aplasie
bis zu 2 Jahre nach HSZT	Immunrekonstitution

### 2.2.3 Komplikationen

Wie bereits angedeutet, ist die HSZT eine Therapieform, die mit einer hohen Zahl von möglichen Risiken und Komplikationen verbunden ist.

Ganz unmittelbar kommt es bereits durch die Toxizität der Konditionierung zu verschiedenen klinischen Erscheinungen wie Entzündung der Schleimhäute des Magen-Darm-Trakts, passagerer Niereninsuffizienz oder Panzytopenie mit transfusionspflichtigem Abfall des Hb-Wertes bzw. der Thrombozyten (Speer et al. 2009).

Als Folge der kompletten Immunsuppression durch die Konditionierung ist das Risiko für Infektionen sehr hoch. Dabei sind während der Phase der Aplasie vor allem bakterielle und fungale (Candida, Aspergillus) Infektionen häufig, im weiteren Verlauf während der Immunrekonstitution kommt es vermehrt zu viralen Infektionen (EBV, HSV, VZV, CMV) (Speer et al. 2009). Insgesamt erkrankten 87% aller allogenen transplantierten Patienten an zumindest einer Infektion nach der Transplantation (Atkinson et al. 1982).

Des Weiteren ist hier die Abstoßungsreaktion zu nennen. In ca. 5-10 % der Fälle kommt es durch verbliebene immunologische Zellen des Empfängers zu einer Immunreaktion auf das körperfremde Transplantat, klinisch ist diese Reaktion häufig verbunden mit Fieber. Die transplantierten Stammzellen können nicht anwachsen und somit persistiert die Phase der Aplasie oder die Zahl der Leuko- und Granulozyten geht nach anfänglichem Anstieg wieder zurück. Therapeutisch bleibt hier nur die erneute Konditionierung und nachfolgend ein weiterer Transplantationsversuch (Speer et al. 2009).

Der genau umgekehrte Mechanismus kommt bei der sog. Graft-versus-Host-Disease (englisch für Transplantat-gegen-Empfänger-Krankheit, kurz GvHD) zum Tragen, die mit 30-80% neben Infektionen und Rezidiven die häufigste Komplikation der HSZT darstellt. Hier kommt es zu einer immunologischen Reaktion der T-Zellen des Transplantates auf Antigene der Zellen des Empfängers. Klinisch kann man zwei Arten der GvHD unterscheiden, die akute und die chronische GvHD.

Die akute GvHD tritt in den ersten 100 Tagen nach HSZT auf und ist gekennzeichnet durch einen Befall der Haut, des Gastrointestinaltrakts und der Leber. Je nach Schweregrad teilt man sie klinisch in 4 Stadien ein (s. Tab. 5).

Tabelle 5: Stadieneinteilung der akuten GvHD nach Organmanifestation. Vergleiche Glucksberg et al. 1974.

	<b>Stadium I</b>	<b>Stadium II</b>	<b>Stadium III</b>	<b>Stadium IV</b>
<b>Haut</b>	makulopapulöses Exanthem < 25% der Körperoberfläche	Makulopapulöses Exanthem 25-50% der Körperoberfläche	generalisiertes Erythem	generalisiertes Erythem mit Blasenbildung und Desquamation
<b>Darm</b>	> 30ml/kg KG oder > 500 ml/Tag Diarrhö	> 60 ml/kg KG oder > 1000 ml/Tag Diarrhö	> 90 ml/kg KG oder > 1500 ml/Tag Diarrhö	> 90 ml/kg KG oder > 2000 ml/Tag Diarrhö + abdominale Schmerzen
<b>Leber</b>	Bilirubin 2,0-3,0 mg/dl	Bilirubin 3,1-6,0 mg/dl	Bilirubin 6,1-15,0 mg/dl	Bilirubin > 15 mg/dl

Die chronische GvHD kann sowohl Folge der akuten GvHD sein, als auch als eigenständiges Krankheitsbild auftreten. Sie manifestiert sich ab dem Tag 100 nach HSZT klinisch ähnlich einer Autoimmunerkrankung mit sklerodermiformer Haut- und Weichteilbeteiligung. Des Weiteren können der Gastrointestinaltrakt, die Leber und auch die Lunge betroffen sein. Die Pathogenese der chronischen GvHD ist noch nicht vollständig erforscht, es gibt Hinweise, dass neben der Immunreaktion des Transplantats auch autoimmunologische Prozesse eine Rolle spielen (Hiddemann et al. 2009). Therapie beider Formen der GvHD ist die Immunsuppression mit Prednisolon.

Richtet sich die Immunantwort des Spenders nicht gegen die Gewebezellen des Empfängers sondern stattdessen gegen residuelle Tumor- bzw. Leukämiezellen, wird dies als sog. Graft-versus-Tumor (GvT) bzw. Graft-versus-Leukemia Effekt (GvL) bezeichnet. Anders als die GvHD ist dieser Effekt keine Komplikation, sondern sogar erwünschter Nebeneffekt der allogenen SZT (Petersen et al. 2007).

Eine weitere Komplikation der HSZT ist die sog. Veno-occlusive-Disease (VOD, deutsch: Lebervenenverschlusskrankheit). Hierbei kommt es aufgrund eines Endothelschadens zum Verschluss der terminalen hepatischen Venolen mit nachfolgender Zerstörung der umliegenden Leberzellen. Dieser Prozess kann bis zum Organversagen fortschreiten. Ausgelöst wird der ursächliche Endothelschaden zum einen durch die Toxizität der Konditionierung, zum anderen durch Zytokinausschüttung. Klinisch manifestiert sich die VOD durch einen schmerzhaften Ikterus, Aszites und progredientes Leberversagen (Speer et al. 2009).

Zuletzt besteht immer die Gefahr eines Rezidivs der Grunderkrankung. Dieses geht von leukämischen Zellen bzw. Tumorzellen aus, die durch die Konditionierung nicht zerstört wurden. Therapeutisch kann durch eine erneute Chemotherapie oder als Ultima Ratio eine Zweittransplantation eine Remission erzielt werden, die Prognose ist jedoch stark abhängig vom Allgemeinzustand der Patienten.

Mehrere Jahre nach HSZT kann es immer noch zu Spätfolgen der Transplantation kommen. Hierzu zählen vor allem restriktive bzw. obstruktive Lungenerkrankungen durch Fibrosierung, Wachstumsstörungen, dentale Hypoplasien und nicht zuletzt Zweittumoren. Letztere treten im Besonderen als EBV-assoziierte Lymphome bereits 1 Jahr nach SZT auf, Zweitleukämien manifestieren sich erst 10-15 Jahre nach SZT (Speer et al. 2009).

### 3 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich verschiedener Parameter der HSZT hinsichtlich ihres Einflusses auf die Immunrekonstitution der verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen.

Dabei wurden Daten von insgesamt 80 Patienten, die im Zeitraum von 1998 bis 2006 an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der FSU Jena eine Stammzelltransplantation erhielten, untersucht und die Immunrekonstitution der Zellpopulationen von B-, T-, T-Helfer-, naiven und memory TH-, zytotoxischen T- und NK-Zellen sowie der Verlauf der T-Zell-Ratio dargestellt.

Danach wurde in insgesamt vier Vergleichen den folgenden Fragestellungen nachgegangen:

- 1) Hat die Stammzellquelle (KM oder PBSZ) einen signifikanten Einfluss auf die Immunrekonstitution?
- 2) Beeinflusst die Transplantationsart (allogen oder autolog) die Immunrekonstitution signifikant?
- 3) Inwiefern hat die CD34+ Selektionierung einen signifikanten Einfluss auf die Immunrekonstitution?
- 4) Besitzt die Konditionierung mit ATG einen signifikanten Einfluss auf die Immunrekonstitution?
- 5) Welche Gründe könnte es für die gefundenen Ergebnisse geben?

## **4 Patienten, Materialien und Methoden**

### **4.1 Patienten**

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden 80 Patienten hinsichtlich ihrer Immunrekonstitution nach HSZT untersucht. Die Transplantationen fanden im Zeitraum von 1998 bis 2006 in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena statt. Eingeschlossen wurden diejenigen Patienten, von denen regelmäßige Zellzahlbestimmungen über einen Zeitraum von 2 Jahren nach HSZT vorlagen.

Das mediane Alter der Patienten lag bei 12 Jahren, das mittlere Alter bei 10 Jahren (0 bis 23 Jahre). Es wurden 44 Jungen (55 %) und 36 Mädchen (45 %) transplantiert.

Indikation zur Transplantation waren verschiedene Grunderkrankungen (s. Abb. 3). Der größte Anteil der Patienten litt an einer akuten lymphoblastischen Leukämie (26 Patienten, 33 %). Jeweils 7 Patienten (9 %) waren an einer akuten myeloischen Leukämie und an einem myelodysplastischen Syndrom erkrankt. Aufgrund eines Neuroblastoms und einer schweren aplastischen Anämie wurden jeweils 5 Patienten (6 %) transplantiert. Bei jeweils 4 Patienten (5 %) lagen eine chronische myeloische Leukämie und eine juvenile chronische Arthritis zugrunde.

Jeweils 3 Patienten (4 %) litten an einem Ewing-Sarkom, einer Mukopolysaccharidose und einem systemischen Lupus erythematodes. Bei jeweils 2 Patienten (3 %) fanden sich eine Osteopetrose und eine juvenile myelomonozytäre Leukämie als Grunderkrankung.

Zuletzt wurde jeweils 1 Patient (1 %) aufgrund einer Adrenoleukodystrophie, einer Aplasie bei Graft Rejection, eines Non-Hodgkin Lymphoms, eines Morbus Hodgkin, eines Hirntumors, eines lymphoblastischen Lymphoms, eines Medulloblastoms, einer Mukolipidose und eines Wiscott-Aldrich-Syndroms transplantiert.

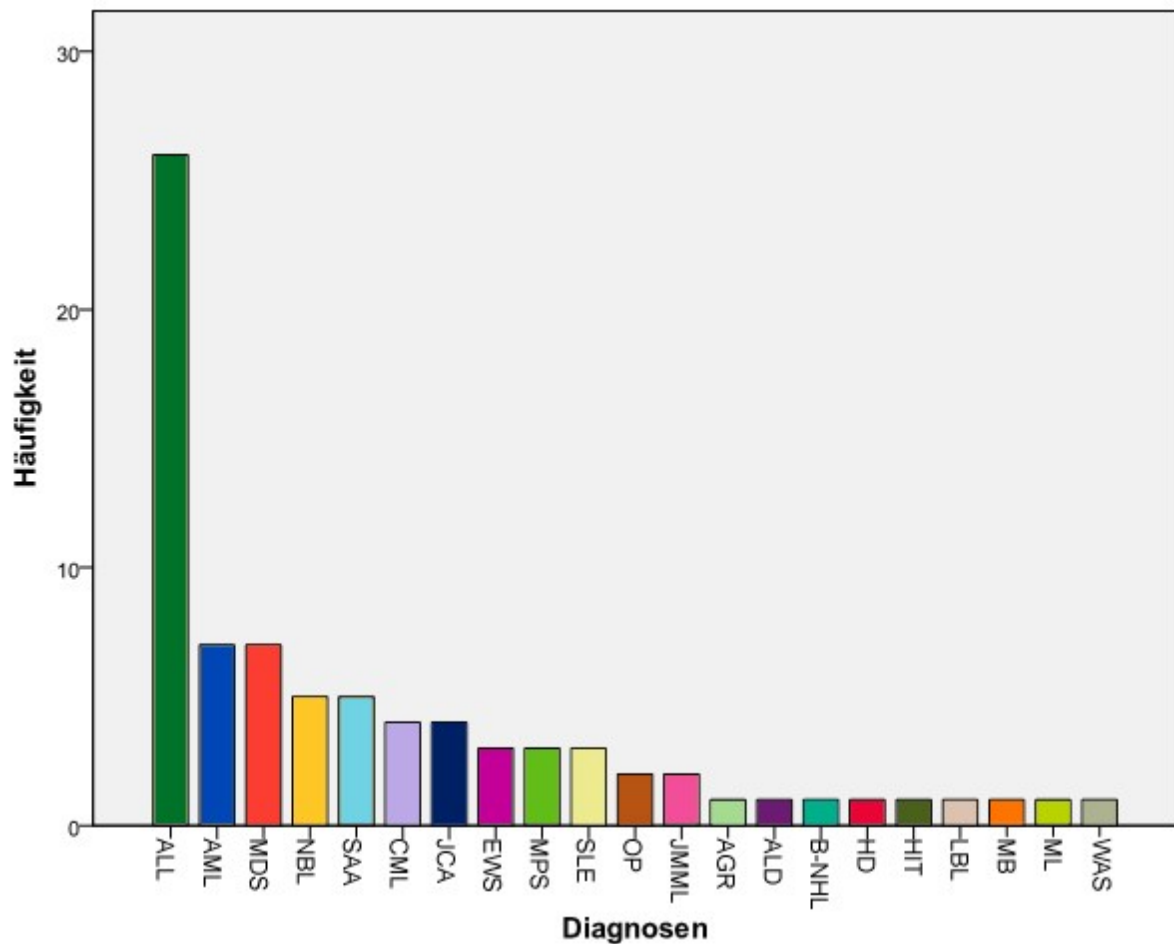


Abbildung 3: Grunderkrankungen der Patienten.

ALL = akute lymphoblastische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, MDS = myelodysplastisches Syndrom, NBL = Neuroblastom, SAA = schwere aplastische Anämie, CML = chronische myeloische Leukämie, JCA = juvenile chronische Arthritis, EWS = Ewing Sarkom, MPS = Mukopolysaccharidose (Typ 1), SLE = systemischer Lupus erythematodes, OP = Osteopetrose, JMML = juvenile myelomonozytäre Leukämie, AGR = Aplasie bei Graft Rejection, ALD = Adrenoleukodystrophie, B-NHL = Non-Hodgkin Lymphom, HD = Morbus Hodgkin, HIT = Hirntumor, LBL = lymphoblastisches Lymphom, MB = Medulloblastom, ML = Mukolipidose, WAS = Wiscott-Aldrich-Syndrom.



Insgesamt wurden 61 allogene (76 %) und 19 autologe (24 %) Transplantationen durchgeführt. Dabei wurde in 39 Fällen (49 %) KM und in ebenso 39 Fällen (49 %) PBSZ verwendet. Aus der Gruppe der Stammzelltransplantierten erhielten 19 Patienten (24 %) unselektionierte SZ und 20 Patienten (25 %) CD34+ selektionierte SZ. Jeweils 1 Patient (1 %) erhielt Nabelschnurblut bzw. eine Kombination von KM und SZ. Das Material stammte bei den mit allogenen Transplantationen in 26 Fällen (33 %) von HLA-identischen Verwandten, in 34 Fällen (43 %) von HLA-kompatiblen Fremd Spendern und in einem Fall (1 %) von einem haploidentischen Spender.

Die Konditionierung erfolgte myeloablativ mit verschiedenen Kombinationen von Chemotherapeutika, teilweise mit zusätzlicher (f)TBI (s. Tab. 7). 44 Patienten (55 %) erhielten dabei ATG, 36 Patienten (45 %) erhielten kein ATG.

Tabelle 6: Patientencharakteristika.

<b>Charakteristika</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>
<b>Patienten insgesamt</b>	80	100
<b>Alter</b>		
medianes Alter	12 Jahre	
mittleres Alter	10 Jahre	
<b>Geschlecht</b>		
männlich	44	55
weiblich	36	45
<b>Stammzellquelle</b>		
KM	39	49
unselektionierte PBSZ	19	24
CD34+ selektionierte PBSZ	20	25
Nabelschnurblut	1	1
KM+PBSZ	1	1
<b>HLA-Verträglichkeit</b>		
HLA-identisch (Familienspende)	26	33
HLA-kompatibel (Fremdspende)	34	43
haploidentisch (Familienspende)	1	1
<b>Transplantation</b>		
autolog	19	24
allogen	61	76
<b>Konditionierung</b>		
mit ATG	44	55
ohne ATG	36	45

Tabelle 7: Konditionierung der Patienten.

Konditionierung	Patientenanzahl	Prozent
ARAC VP16 BCNU	1	1,3
BU CY TEPA ATG	1	1,3
BU CY VP16	1	1,3
BU CY VP16 ATG	1	1,3
BUFEX CY	1	1,3
CY ATG FLU URB	1	1,3
CY FLU ATG	1	1,3
CY FLU CAM	1	1,3
fTBI (Ovarien) VP16 ATG	1	1,3
fTBI VP16 TEPA ATG	1	1,3
MEL Treosulfan	1	1,3
VP16 CBPT	1	1,3
VP16 CBPT TEPA	1	1,3
BU MEL	2	2,5
BU MEL FLU ATG	2	2,5
TBI FLU URB CAM	2	2,5
TEPA FLU ATG	2	2,5
BU TBI ATG	3	3,8
TBI ATG	3	3,8
fTBI CY ATG	4	5,0
BU CY	5	6,3
BU CY MEL	5	6,3
CY FLU URB ATG	5	6,3
VP16 MEL CBPT	5	6,3
BU CY MEL ATG	6	7,5
fTBI VP16	10	12,5
fTBI VP16 ATG	13	16,3

ARAC = Cytosin-Arabinosid, VP16 = Vepesid, BCNU = Carmustin, BU = Busulfan,  
 CY = Cyclophosphamid, TEPA = Thiotepa, ATG = Antithymozytenglobulin, FLU = Fludarabin,  
 URB = Urbason, CAM = Campath, fTBI = fraktionierte Ganzkörper-Bestrahlung, TBI = totale  
 Ganzkörper-Bestrahlung, MEL = Melphalan, CBPT = Carboplatin.

## **4.2 Materialien**

Um die Immunrekonstitution der Zellreihen an mehreren Zeitpunkten nach HSZT vergleichen zu können, wurden pro Patient insgesamt 7 Messungen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Dabei wurden Blutproben (EDTA-Monovette) mit den entsprechenden, markierten Antikörpern inkubiert und anschließend der relative Anteil der verschiedenen Zellreihen in der Probe bestimmt.

### **4.2.1 Antikörper**

Die verwendeten Antikörper stammten von verschiedenen Herstellern, Dako aus Hamburg und Beckman Coulter aus Krefeld, und waren bereits mit den entsprechenden Farbstoffen markiert. Für die vorliegende Analyse fanden

3 Farbstoffe Verwendung, Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, grün), Phycoerythrin (PE, gelb) und Phycoerythrin-Cyanin-5 (PC5, rot).

B-Zellen wurden dabei mit monoklonalen Antikörpern gegen CD19 und CD20 nachgewiesen, T-Zellen mit CD3, CD4, CD8, CD4/45 RO und CD4/45 RA – Antikörpern und NK-Zellen mit Antikörpern gegen CD16/56. Die Negativ-Kontrolle erfolgte mit IgG-Antikörpern der Firma Beckman Coulter, die entweder mit FITC, PE oder mit PC5 markiert waren. Die jeweils verwendete Menge richtete sich nach den Angaben der Hersteller. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über Antikörper, Farbstoffe und Hersteller.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Antikörper inkl. Farbstoffe und Hersteller.

Antikörper gegen	Farbstoff	Hersteller
<b>B-Zellen</b>		
CD 20+	FITC	Dako (Hamburg – Deutschland)
CD 19+	PE	Dako (Hamburg – Deutschland)
<b>T-Zellen</b>		
CD 3+	FITC	Dako oder Beckman Coulter (Hamburg bzw. Krefeld – Deutschland)
CD 4+	PC5	Beckman Coulter (Krefeld – Deutschland)
CD 8+	PE	Dako (Hamburg – Deutschland)
CD 45RO+	FITC	Dako (Hamburg – Deutschland)
CD 45RA+	PE	Dako (Hamburg – Deutschland)
<b>NK-Zellen</b>		
CD 16+56+	PE	Beckman Coulter (Krefeld – Deutschland)
<b>Kontrolle</b>		
IgG	PE	Beckman Coulter (Krefeld – Deutschland)
IgG	FITC	Beckman Coulter (Krefeld – Deutschland)

## 4.2.2 Reagenzien und Geräte

Alle für die vorliegende Analyse verwendeten Reagenzien und Geräte sind in Tabellen 9 und 10 dargestellt.

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Hersteller.

Reagenzien	Hersteller
Antikörper-Lösung (je nach Typ und Hersteller, s. Tab. 8)	
Lyse Kit (Coulter Multi TQ-Prep+Reagenzien Kit)	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Systemflüssigkeit (Isoton II)	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Geräte und Hersteller.

Geräte	Hersteller
EDTA-Monovette (2,7 ml)	Sarstedt (Nümbrecht – Deutschland)
Pipetten, Multipipette	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf – Deutschland)
Einmalpipettenspitzen	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf – Deutschland)
5ml PP-Röhrchen	Greiner (Frickenhäusen)
Serocent (Waschzentrifuge)	Baxter (Unterschleißheim – Deutschland)
Durchflusszytometer (Coulter EPICS XL-MCL) mit SYSTEM II - Software	Beckman Coulter (Krefeld – Deutschland)
Coulter TQ-prep (Lysierautomat)	Beckman Coulter (Krefeld – Deutschland)

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie ist ein weltweit anerkanntes Verfahren zur Quantifizierung von Zellpopulationen in einer Probe sowie zur Analyse von Zelltyp-spezifischen physikalischen bzw. molekularen Eigenschaften. Sie findet vor allem in der Hämatologie und der Immunologie/Infektiologie Verwendung.

Um spezifische Zellpopulationen zu identifizieren, werden charakteristische Oberflächenproteine dieser Zellen (sog. CD = cluster of differentiation) mit Antikörpern markiert, die ihrerseits an fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind.

Zur quantitativen Analyse der Zellgruppen werden die markierten Zellen in einem sehr dünnen Flüssigkeitsstrahl an einem Laser vorbeigeleitet, sodass jeweils nur eine Zelle die Lichtquelle passiert. Von jeder Zelle erhält der Durchflusszytometer nun drei Informationen: die Größe der Zelle (erkennbar anhand der Vorwärts-Lichtstreuung, engl. forward scatter), die Granularität der Zelle (erkennbar an der Seitwärts-Lichtstreuung, engl. side scatter) und die Intensität der Fluoreszenz durch die fluoreszierenden Antikörper, die an der Zelle gebunden sind. Mithilfe der entsprechenden Analyse-Software werden dann die Ergebnisse in Zweiparameterdarstellung (sog. Dot-plots) und in tabellarischer Form aufbereitet.

Somit ist es möglich, Aussagen zum relativen Anteil einer definierten Zellpopulation in der analysierten Probe zu treffen.

Tabelle 11 : Übersicht über die analysierten Zellpopulationen.

CD-Profil	Zellpopulation
CD 20±/19+/10±	B-Zellen
CD 3+	T-Zellen
CD 3+/8-/4+	T-Helfer-Zellen
CD 3+/8+/4-	zytotoxische T-Zellen
CD 3-/16+56+/8±	NK-Zellen
CD 45RO-CD45RA+/4+	naive TH-Zellen
CD 45RO+CD45RA-/4+	memory TH-Zellen

### **4.3.2 Durchführung**

Die Blutproben wurden in 2,7 ml EDTA-Monovetten asserviert und bis zur Messung aufbewahrt. Zur Analyse wurden jeweils 100 µl Blut aus der Monovette entnommen und zusammen mit der entsprechend der Herstellerangaben bemessenen Antikörpermengung in ein 5 ml PP-Röhrchen gegeben. Die Ansätze wurden anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Lyse der Erythrozyten mithilfe des Coulter TQ-Prep+Reagenzien Kit. Im Anschluss wurden die Ansätze mit 3 ml isotonischer Systemflüssigkeit bei  $2950 \text{ min}^{-1} \times g$  für 30 Sekunden zentrifugiert und gewaschen (Sero-cent). Die einzelnen Proben wurden je nach Zellzahl in 300µl oder 400µl Systemflüssigkeit aufgenommen, aufgeschüttelt und im Durchflusszytometer Coulter EPICS XL-MCL analysiert.

### **4.3.3 Statistische Methoden**

Die mithilfe der SYSTEM II – Software gewonnenen Rohdaten entsprachen den relativen Zellzahlen innerhalb der jeweiligen Probe. Daher wurden diese zunächst in absolute Zellzahlen umgerechnet. Dies erfolgte unter Verwendung der absoluten Leukozytenzahlen, die mit den Prozentwerten der Zellgruppen multipliziert und danach durch den Faktor 100 dividiert wurden. Nach entsprechender Umrechnung der Einheiten ergaben sich dann die absoluten Zellzahlen in Zellen pro µl.

Zusätzlich zu den jeweiligen Zellpopulationen wurde die T-Zell-Ratio in die Berechnungen mit einbezogen. Dabei handelt es sich um den Quotient aus den CD4 geteilt durch die CD8 positiven T-Zellen.

Alle für die vorliegende Arbeit verwendeten Daten wurden mit freundlicher Unterstützung durch die medizinische Dokumentation der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin erhoben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Unterstützung und Beratung durch das Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der Universitätsklinik Jena.

Um einen signifikanten Unterschied in der Immunrekonstitution zwischen den jeweiligen Patientengruppen nachzuweisen, wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet, da die beobachteten Daten nicht die Kriterien einer Normalverteilung

erfüllten. Verglichen wurden jeweils die Medianwerte der absoluten Zellzahlen sowie der T-Zell-Ratio an den einzelnen Messzeitpunkten, d.h. an Tag 30, 60, 100, 180, 360, 540 und 720 nach HSZT. Als Signifikanzniveau wurde  $p = 0,05$  festgelegt. Zusätzlich wurde beobachtet, ab welchem Tag nach HSZT die untere Normgrenze der jeweiligen Zellpopulation für Kinder im Alter zwischen 11 und 16 Jahren (Comans-Bitter et al. 1997 und McCloskey et al. 1997) erreicht war.

Für die statistischen Berechnungen wurde das Statistik-Programm SPSS 18.0 verwendet. Die tabellarische und grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe von Microsoft Office Word 2003 und Adobe Photoshop CS.

Zur Literaturrecherche und –Verwaltung wurde das Programm Citavi verwendet.

## 5 Ergebnisse

In den nachfolgenden Grafiken werden die zeitlichen Verläufe der jeweiligen Zellpopulationen aufgeteilt in die beiden zu vergleichenden Gruppen dargestellt.

Die Abszisse zeigt die sieben Messzeitpunkte von Tag 30 bis zu Tag 360, die Ordinate die absoluten Zellzahlen. Der absolute Wert (Median) wird durch einen Kreis symbolisiert, die Fehlerbalken repräsentieren das 95 %-Konfidenzintervall.

Gibt es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Wilcoxon-Mann-Whitney), so wird dies durch ein Kreuz symbolisiert.

Jede Grafik beinhaltet zudem die untere Normwertgrenze der jeweiligen Zellpopulation für 10-16jährige Kinder (Comans-Bitter et al. 1997, McCloskey et al. 1997; s. Tab. 12).

Tabelle 12: Untere Normwerte der Zellpopulationen für Kinder im Alter von 10-16 Jahren.

<b>Zellpopulation</b>	<b>unterer Normwert</b>
B-Zellen	200 Zellen/ $\mu$ l
T-Zellen	1000 Zellen/ $\mu$ l
TH-Zellen	500 Zellen/ $\mu$ l
zytotoxische T-Zellen	300 Zellen/ $\mu$ l
naive TH-Zellen	200 Zellen/ $\mu$ l
memory TH-Zellen	225 Zellen/ $\mu$ l
NK-Zellen	100 Zellen/ $\mu$ l
T-Zell-Ratio	0,9



## 5.1 Vergleich KM und PBSZ

Von den insgesamt 80 untersuchten Patienten erhielten 39 Patienten (49 %) KM und 19 Patienten (24 %) unselektierte PBSZ.

Um die Gruppen möglichst in allen anderen Parametern homogen zu halten, wurden von den 19 Patienten mit PBSZ nur diejenigen ausgewählt, die ebenso wie alle Patienten mit KM allogene transplantiert wurden. Somit ergab sich eine Gesamtzahl von 14 Patienten (18 %), die PBSZ erhielten und allogene transplantiert wurden. Im statistischen Vergleich dieser beiden Gruppen zeigen sich nur punktuelle signifikante Unterschiede in der Immunrekonstitution. Dabei treten diese nur am ersten Messzeitpunkt, am Tag 30 nach HSZT, auf und betreffen die Population der B-Zellen, NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und memory-TH-Zellen. Im weiteren zeitlichen Verlauf ergeben sich keine signifikanten Unterschiede mehr. Zudem lässt sich nur schwer ein Trend hinsichtlich eines deutlichen Vorteils der einen Gruppe gegenüber der anderen ausmachen, da bei den B-Zellen die Gruppe der Patienten mit PBSZ statistisch signifikant eine höhere Zellzahl aufweist und bei den restlichen, signifikant unterschiedlichen Populationen die Gruppe der Patienten, die KM erhalten hatte.

Auch in Bezug auf die untere Normwertgrenze verhalten sich beide Gruppen nahezu gleich. Einzig bei den TH-Zellen erreicht die Gruppe der KM-transplantierten Patienten die untere Normgrenze bereits am Tag 360 nach HSZT, wohingegen die Gruppe der Patienten, die PBSZ erhalten hatte, diese erst am Tag 540 nach HSZT überschreitet.

Tabelle 13: Übersicht über die statistisch signifikanten Unterschiede mit p-Wert (Wilcoxon-Mann-Whitney) im Vergleich der Immunrekonstitution nach Transplantation von KM und PBSZ

<b>Zellpopulation</b>	<b>Tag</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Art des Unterschieds</b>
B-Zellen	30	0,004	PBSZ > KM
NK-Zellen	30	0,035	KM > PBSZ
zytotoxische T-Zellen	30	0,011	KM > PBSZ
memory-TH-Zellen	30	0,001	KM > PBSZ

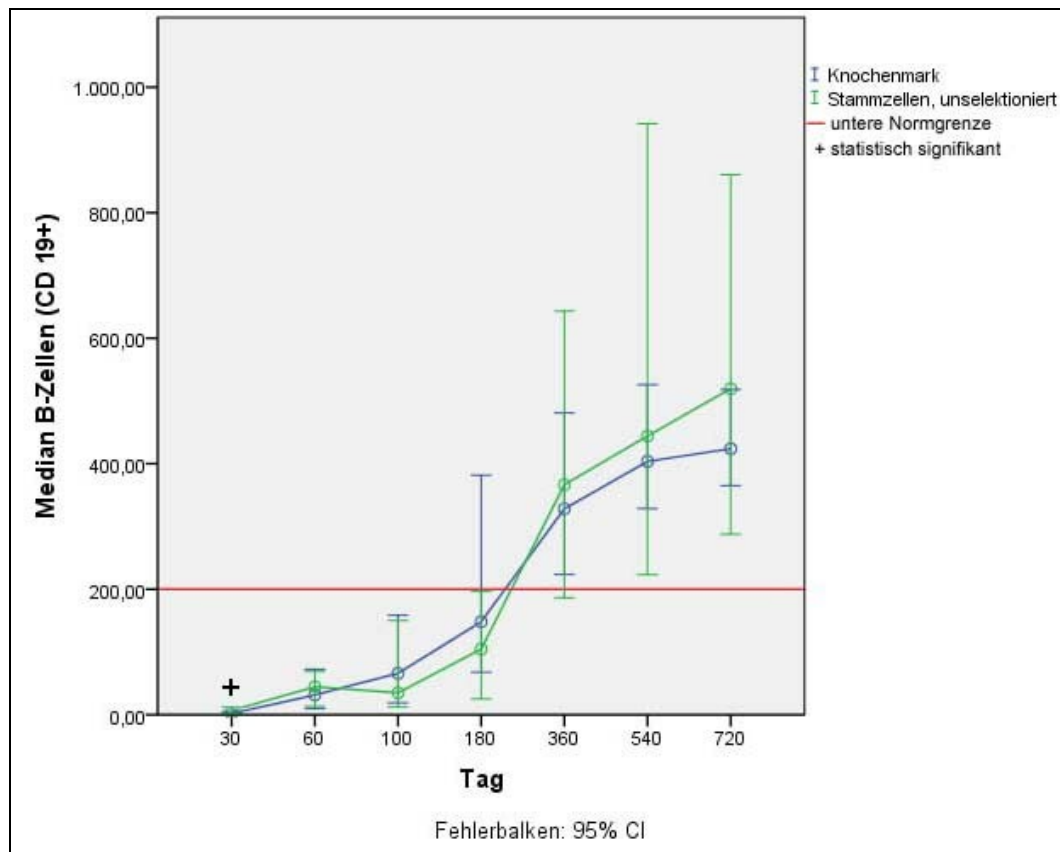


Abbildung 4: Immunrekonstitution der B-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ.

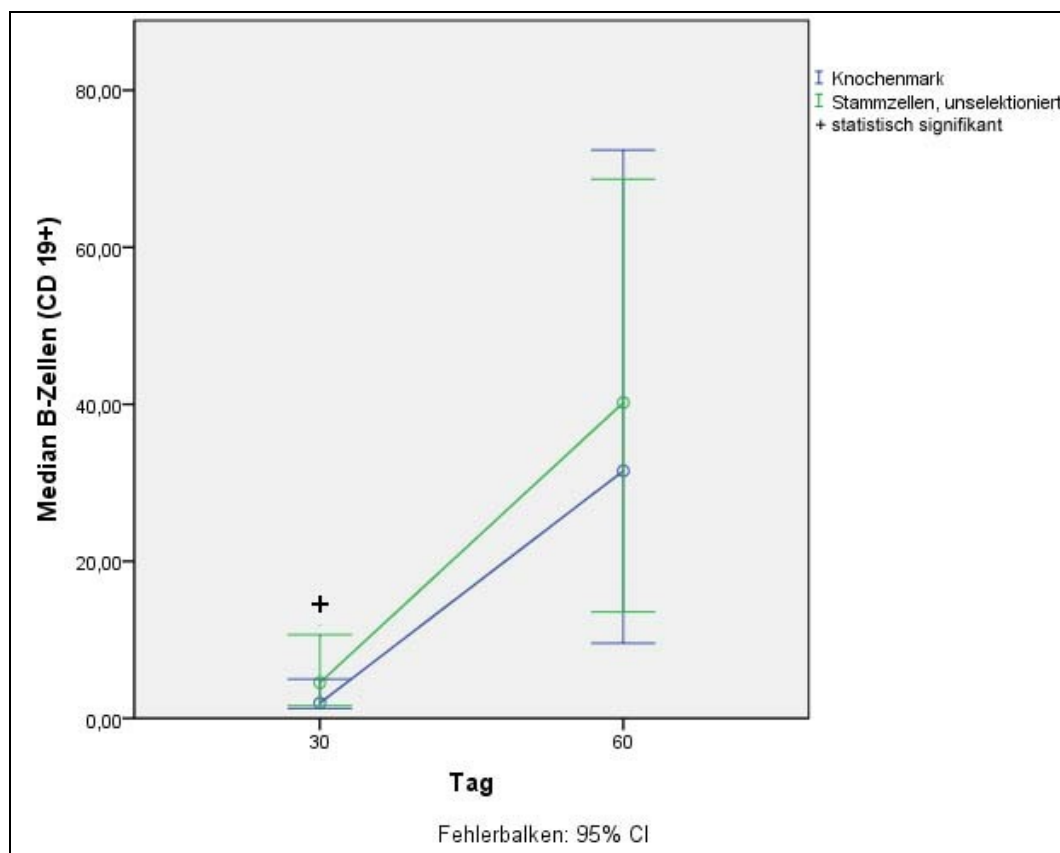


Abbildung 5: Immunrekonstitution der B-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ (Darstellung nur bis Tag 60).

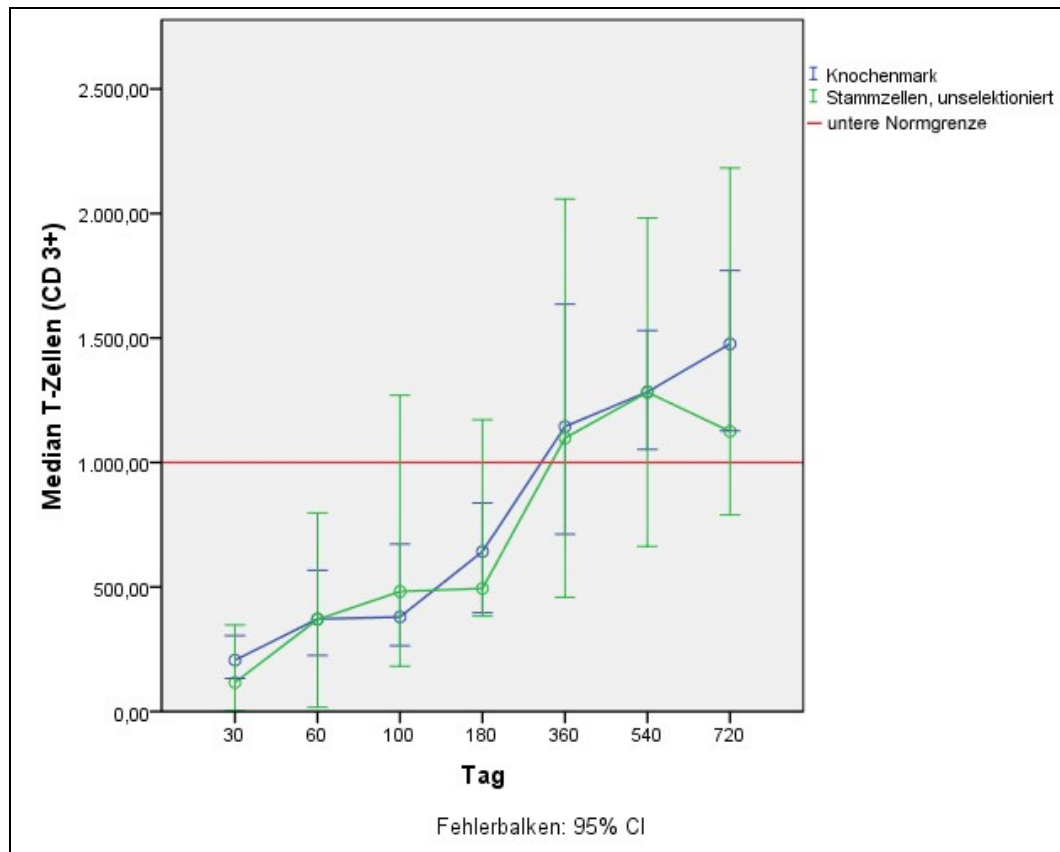


Abbildung 6: Immunrekonstitution der T-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ.

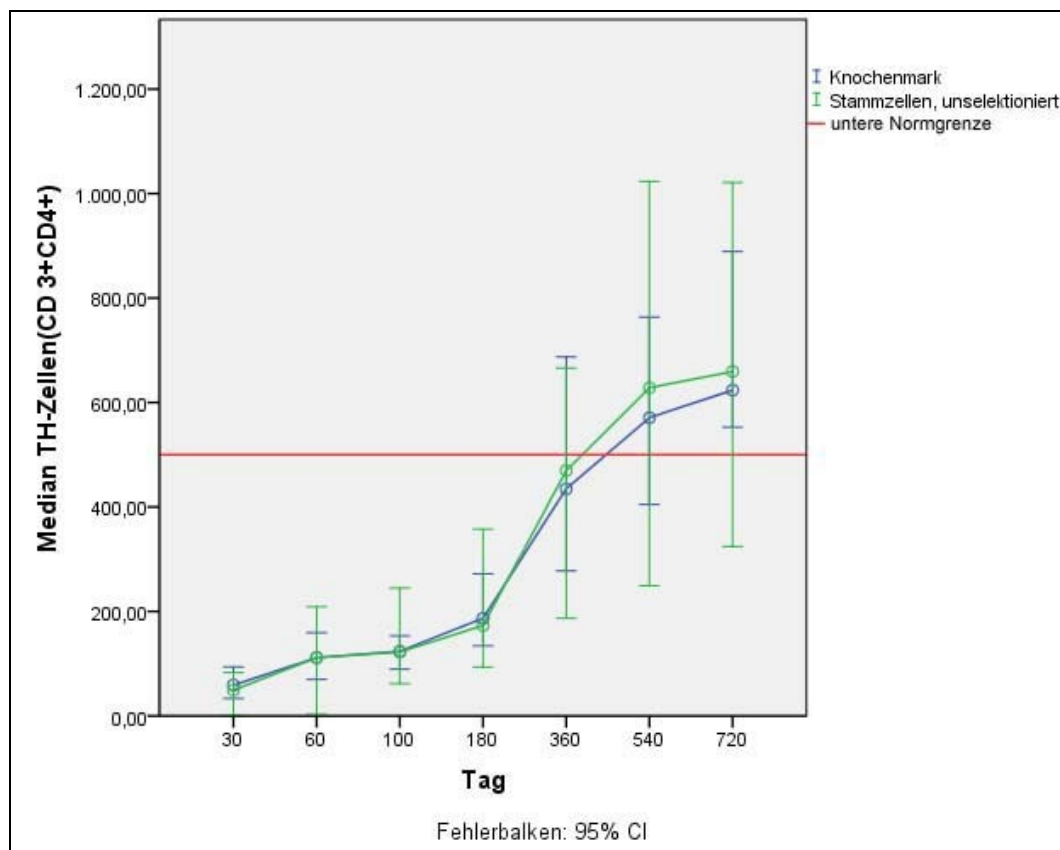


Abbildung 7: Immunrekonstitution der TH-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ.

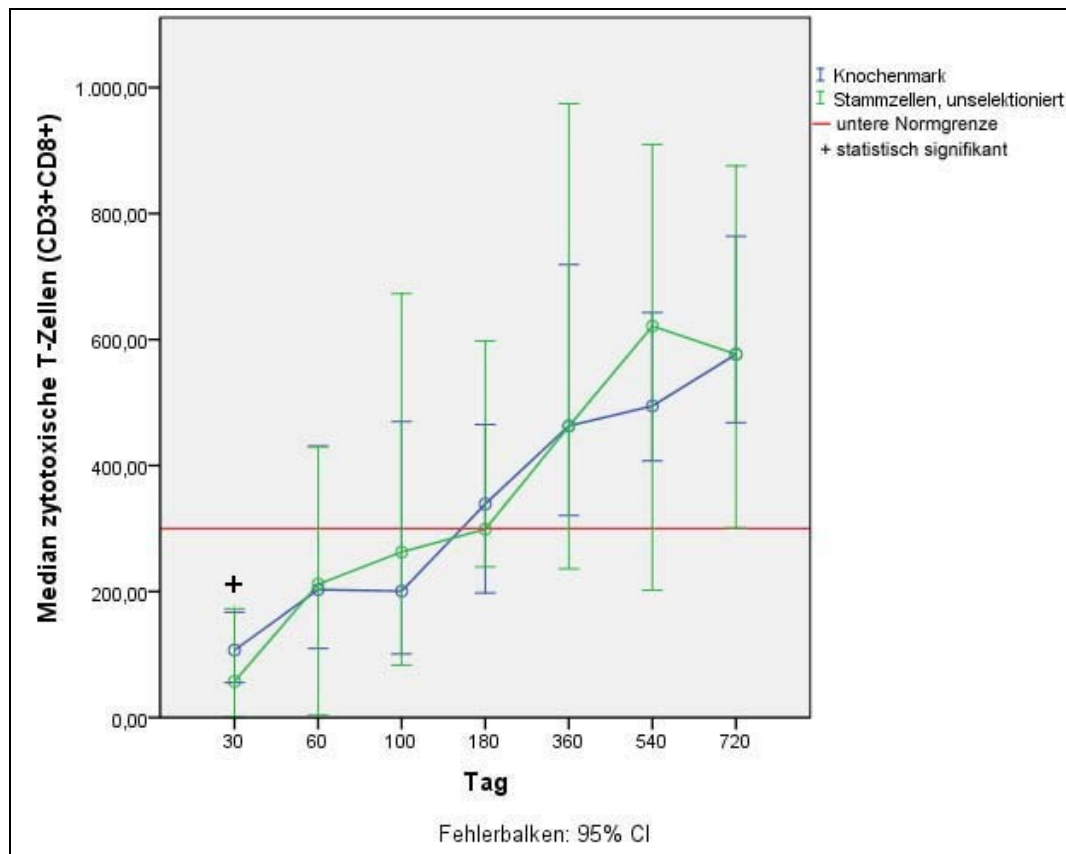


Abbildung 8: Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ.

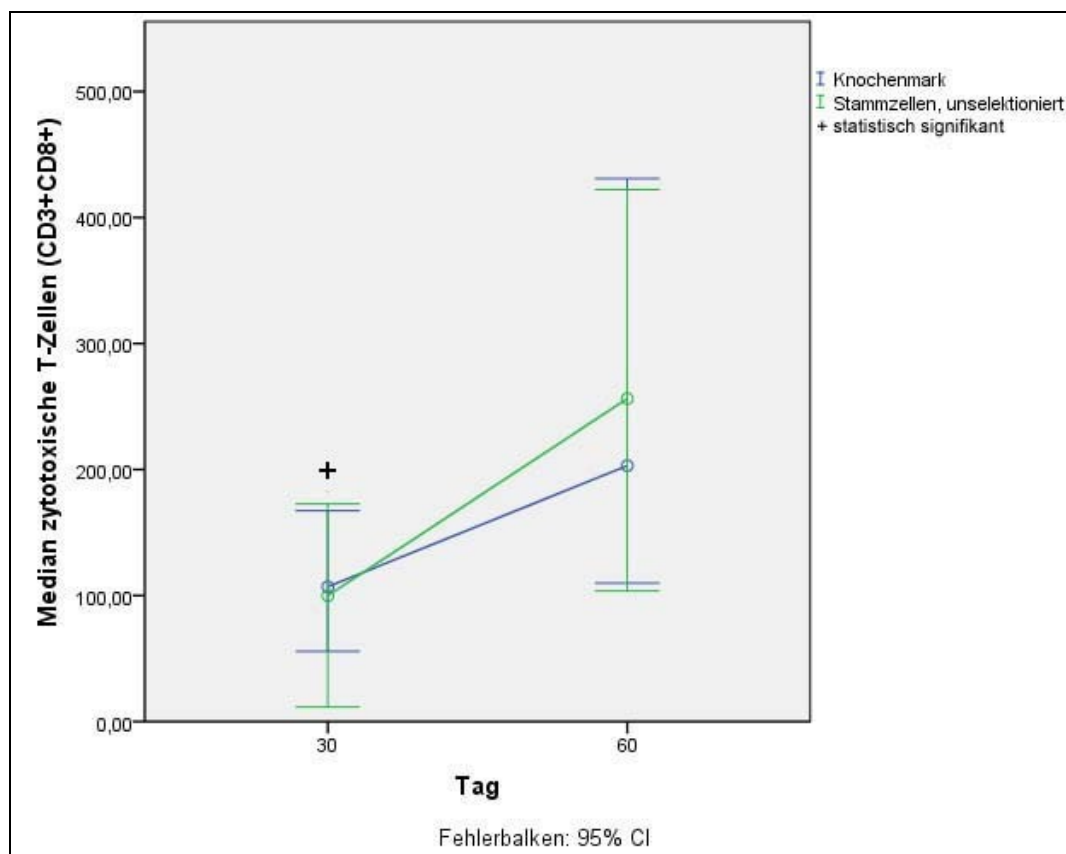


Abbildung 9: Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ (Darstellung nur bis Tag 60).

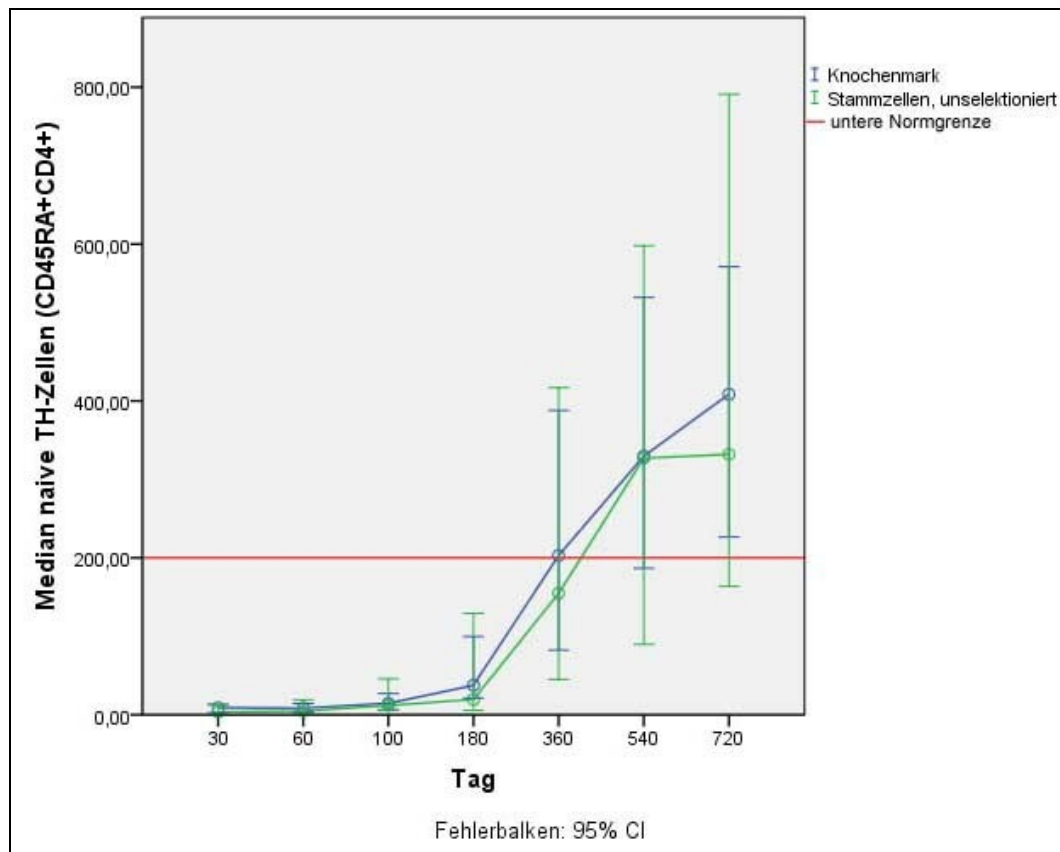


Abbildung 10 : Immunrekonstitution der naiven TH-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ.

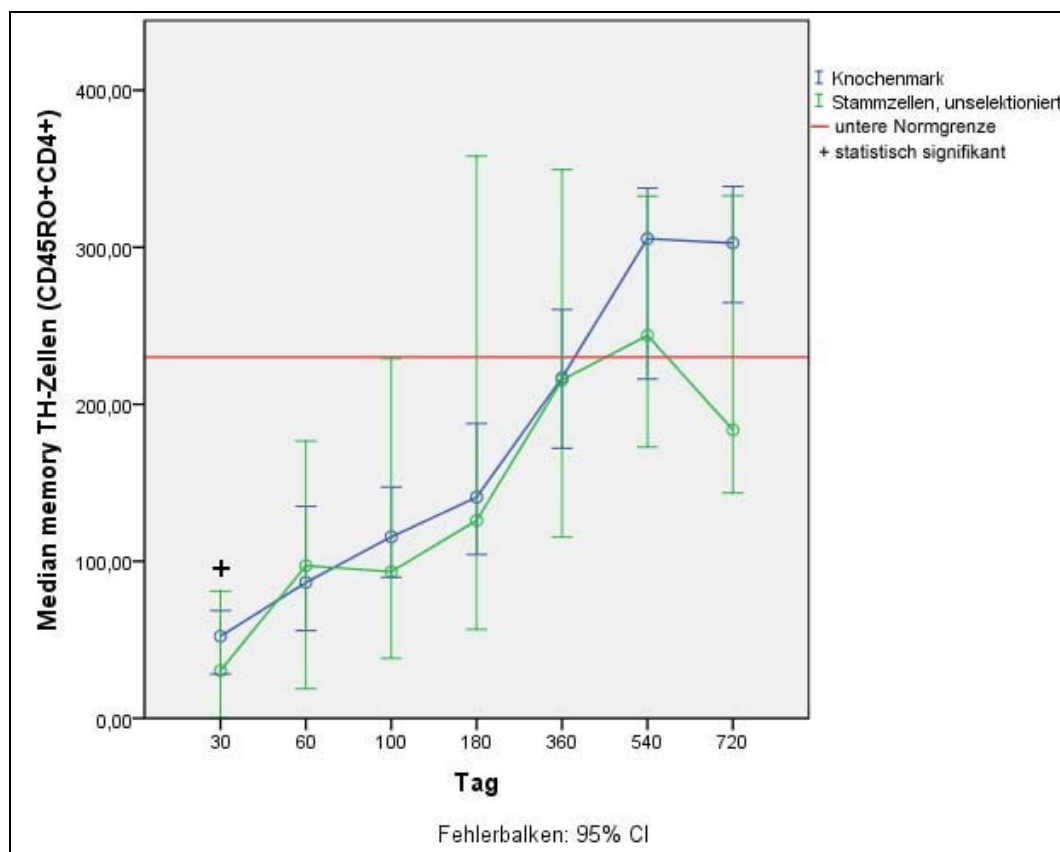


Abbildung 11: Immunrekonstitution der memory TH-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ.

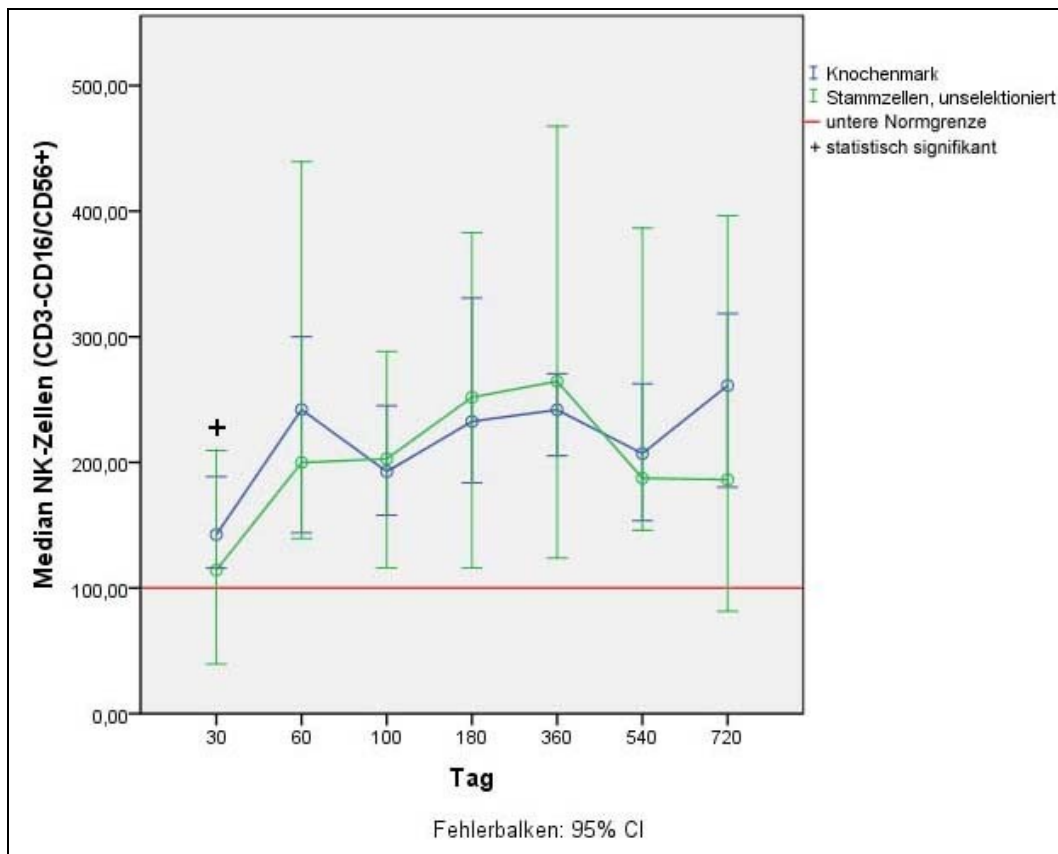


Abbildung 12: Immunrekonstitution der NK-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ.

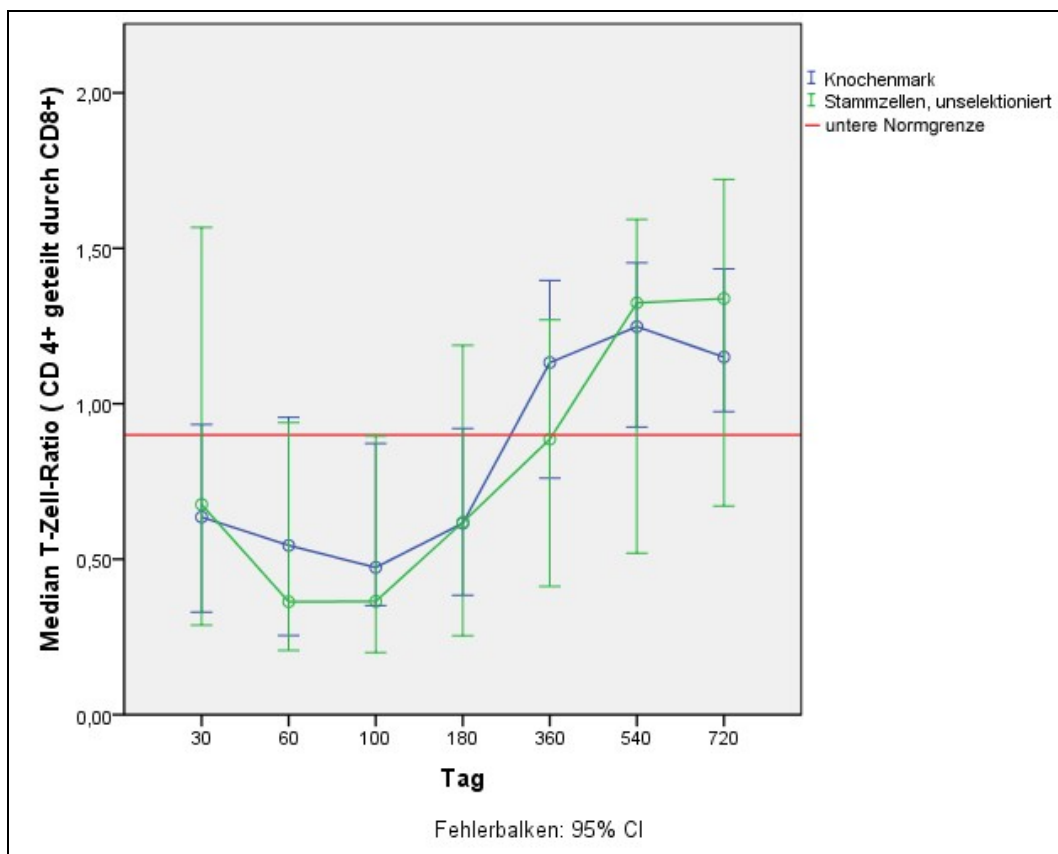


Abbildung 13: Immunrekonstitution der T-Zell-Ratio nach Transplantation von KM versus PBSZ.

## 5.2 Vergleich autologe und allogene Transplantation

Hinsichtlich der Art der Transplantation erfolgte bei 61 Patienten (76 %) eine allogene Transplantation, bei 19 Patienten (24 %) eine autologe Transplantation.

In der Gruppe der allogenen Transplantation befinden sich sowohl Patienten, die KM erhielten, als auch Patienten mit PBSZ. Um auch in diesem Vergleich möglichst homogene Gruppen zu erzielen, wurden nur die PBSZ-transplantierten Patienten einbezogen, das heißt insgesamt 19 Patienten (24 %), die autologe PBSZ erhielten, und 20 Patienten (25 %) mit allogener PBSZ-Transplantation.

Eine weitere Differenzierung der Gruppen hinsichtlich CD34+ selektionierten Stammzellen war aus statistischen Gründen nicht möglich, da die Gruppen dann mit Patientenzahlen von 5 bzw. 6 Patienten für eine statistische Auswertung zu klein waren.

Im Vergleich der autolog gegen die allogenen transplantierten Patienten zeigen sich statistisch signifikant höhere Zellzahlen der autologen Gruppe in der Population der TH-Zellen und der naiven TH-Zellen, insbesondere gegen Ende des beobachteten Zeitraums, also an den Tagen 180 und 360 nach Transplantation. Betrachtet man die grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der TH-Zellpopulation (s. Abbildung 16), fällt auf, dass zwischen Tag 180 und 360 die Gruppe der autolog transplantierten Patienten sprunghaft die allogene Gruppe überholt und bis zum Ende des beobachteten Zeitraums höhere Zellzahlen aufweist. Vor dem Tag 180 jedoch verlaufen die Kurven beider Gruppen nahezu identisch.

Bei der Population der NK-Zellen ergibt sich ein umgekehrter Effekt, hier hat die Gruppe der allogenen transplantierten Patienten signifikant höhere Zellzahlen an den Tagen 180 und 360. Auch in diesem Fall zeigt sich in der Grafik (s. Abbildung 20) der Unterschied erst ab Tag 100 und bleibt bis zum Tag 360 bestehen. Auffällig ist außerdem bei den NK-Zellen, dass bereits ab dem Tag 30 beide Kurven oberhalb der Normwertgrenze verlaufen.

Alle anderen Zellpopulationen zeigen einen nahezu identischen Kurvenverlauf der beiden Gruppen ohne signifikante Unterschiede. Einzig im Vergleich der Population der zytotoxischen T-Zellen weist die Gruppe der allogenen transplantierten Patienten ab dem Tag 100 höhere Zellzahlen auf als die autologe Gruppe, jedoch wie bereits erwähnt ohne statistische Signifikanz (s. Abbildung 17). Die fehlende Signifikanz ist hier am ehesten durch die große Streubreite der Werte zu erklären.

Bezüglich der unteren Normwertgrenze lässt sich feststellen, dass die meisten Zellpopulationen diese zeitgleich erreichen, B-,T- und zytotoxische T-Zellen ab Tag 360, memory TH-Zellen ab Tag 540 und NK Zellen bereits von Tag 30 an.

Bei den TH-Zellen und den naiven TH-Zellen ist die Gruppe der autolog transplantierten Patienten bereits ab Tag 360 oberhalb der unteren Norm, die allogene Gruppe erreicht diese erst ab Tag 540. Am eindrucklichsten ist der Unterschied anhand der T-Zell-Ratio zu erkennen, hier überschreitet die autologe Gruppe die untere Normwertgrenze schon ab Tag 100, die allogene erst ab Tag 540. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die autolog transplantierten Patienten insgesamt einen schnelleren Anstieg der Zellpopulationen zeigen, ausgenommen die Population der NK-Zellen und der zytotoxischen T-Zellen, hier ist der Trend umgekehrt.

Tabelle 14: Übersicht über die statistisch signifikanten Unterschiede mit p-Wert (Wilcoxon-Mann-Whitney) im Vergleich der Immunrekonstitution nach autologer und allogener Transplantation.

<b>Zellpopulation</b>	<b>Tag</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Art des Unterschieds</b>
TH - Zellen	360	0,026	autolog > allogen
naive TH-Zellen	30	0,023	autolog > allogen
	180	0,027	autolog > allogen
	360	0,026	autolog > allogen
NK-Zellen	180	0,009	allogen > autolog
	360	0,006	allogen > autolog
T – Zell Ratio	100	0,001	autolog > allogen



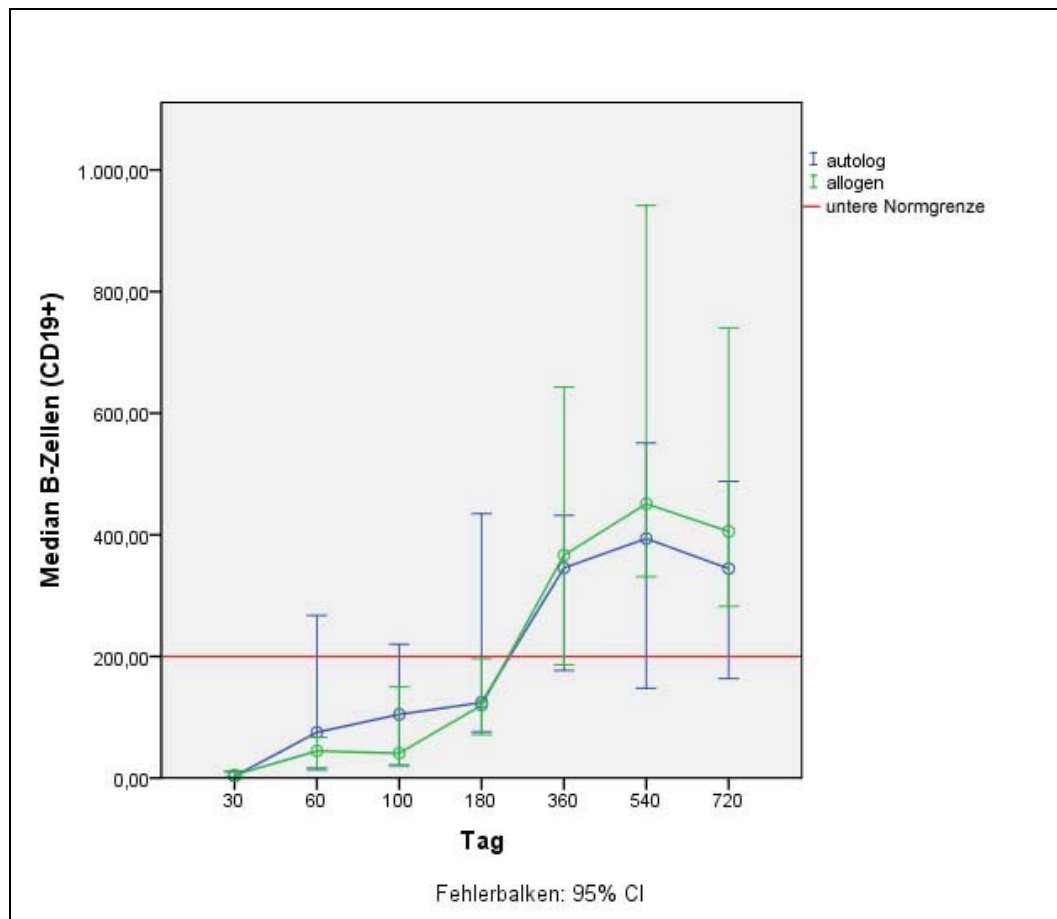


Abbildung 14: Immunrekonstitution der B-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation.

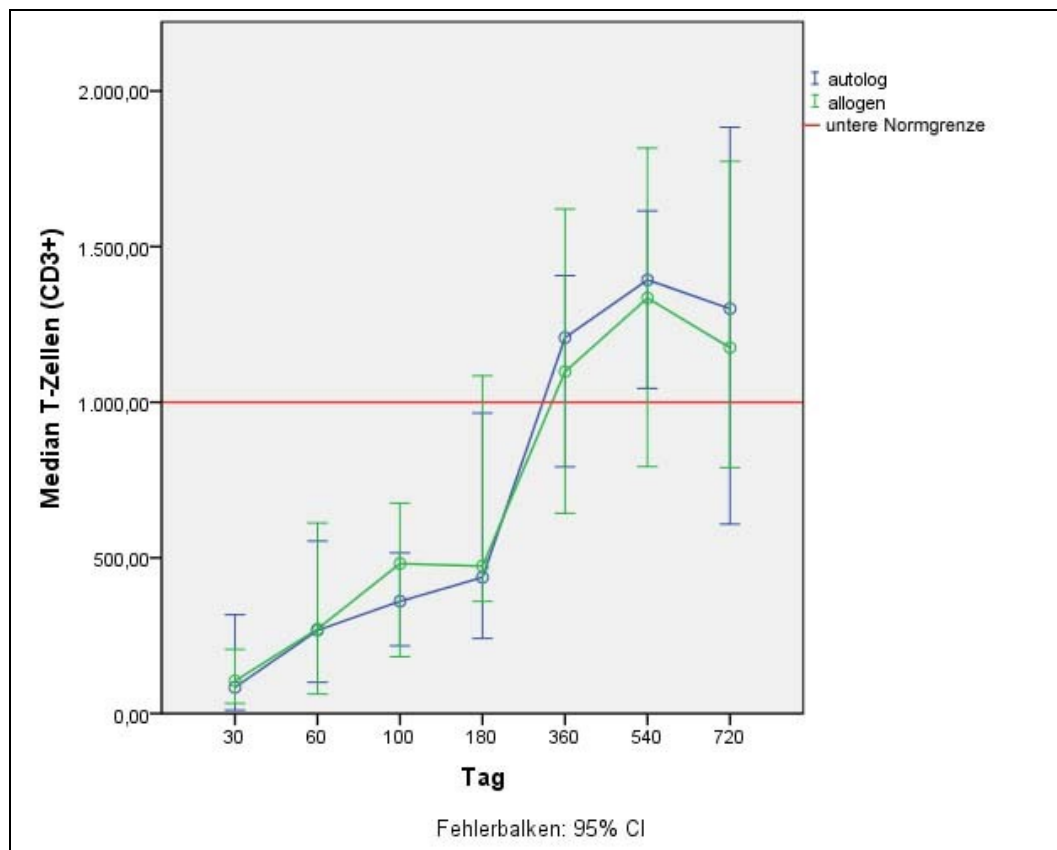


Abbildung 15: Immunrekonstitution der T-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation.

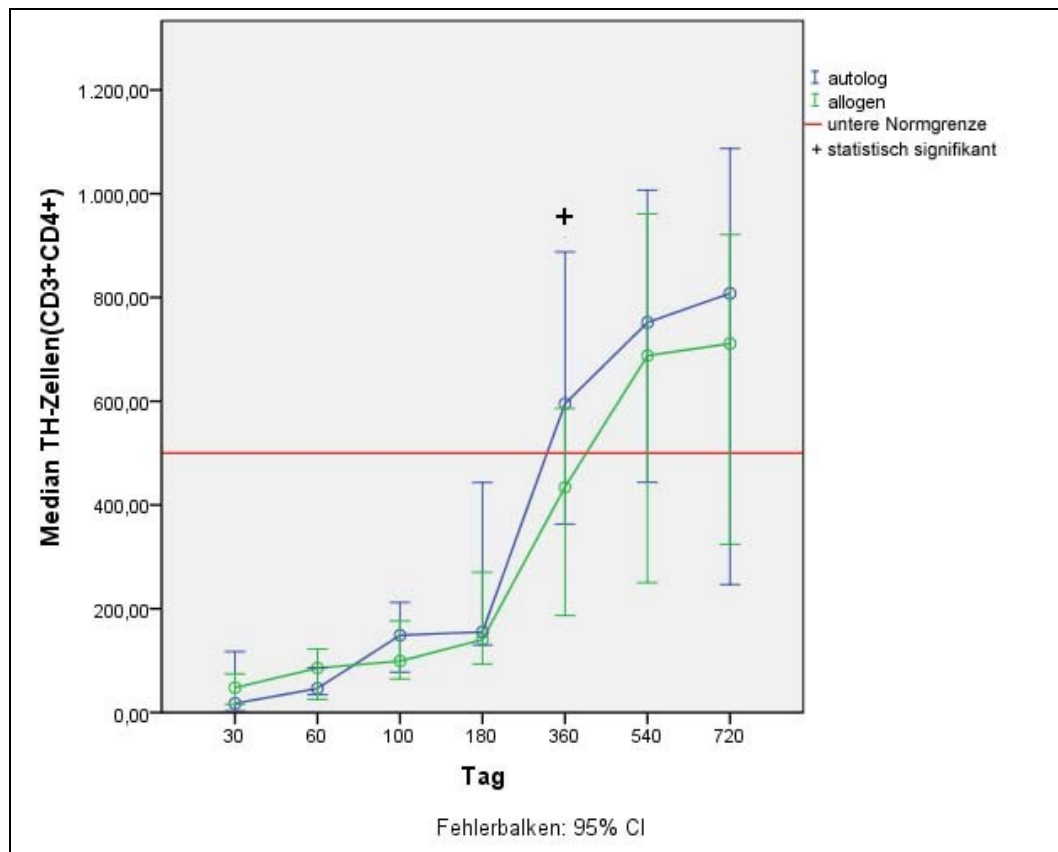


Abbildung 16: Immunrekonstitution der TH-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation.

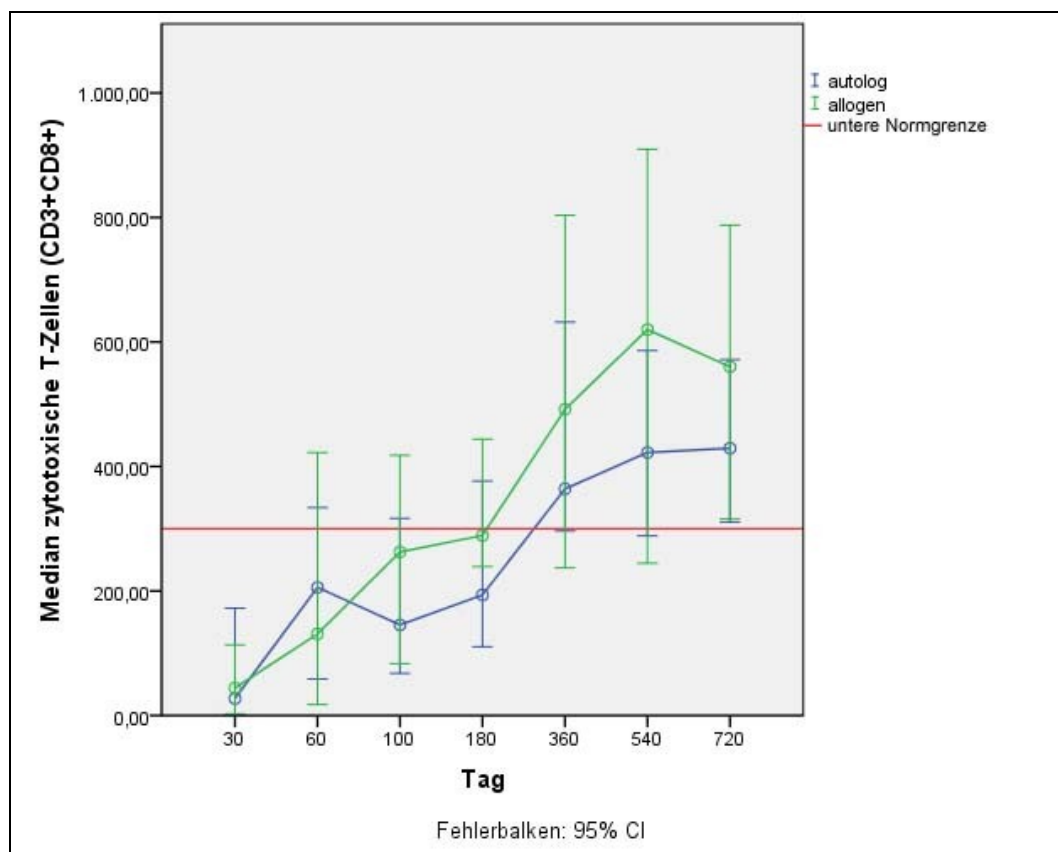


Abbildung 17: Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation.

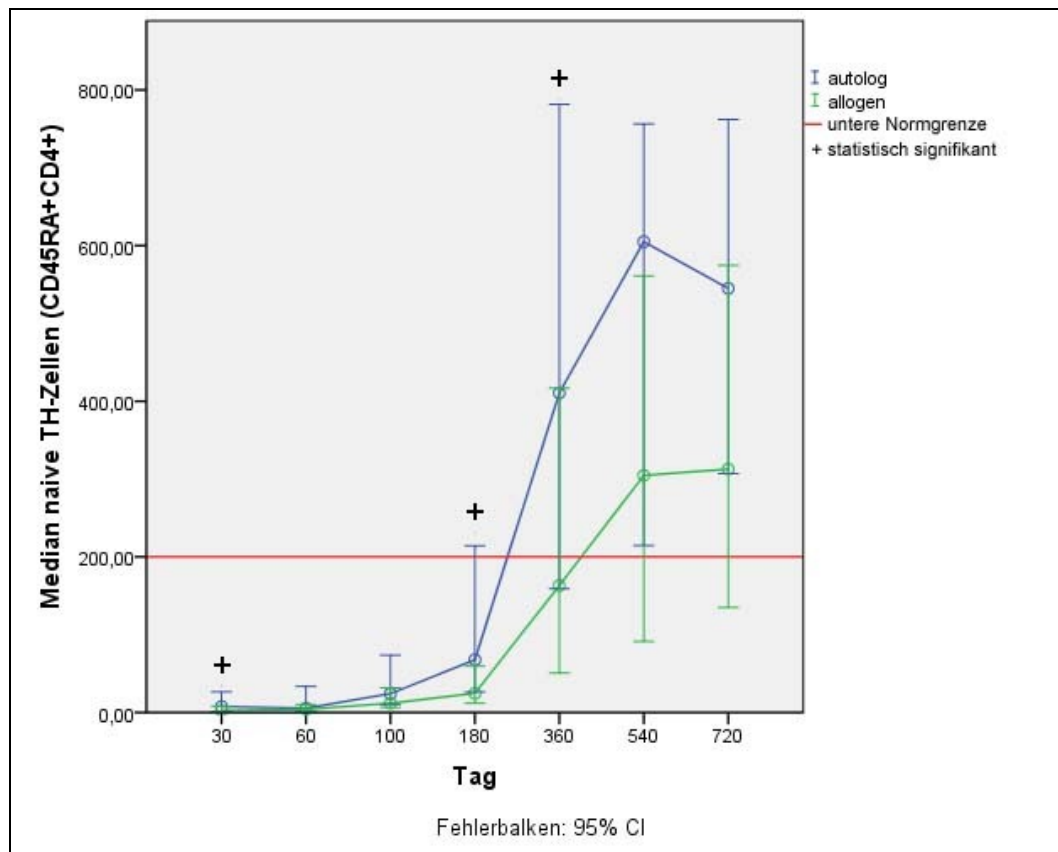


Abbildung 18: Immunrekonstitution der naiven TH-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation.

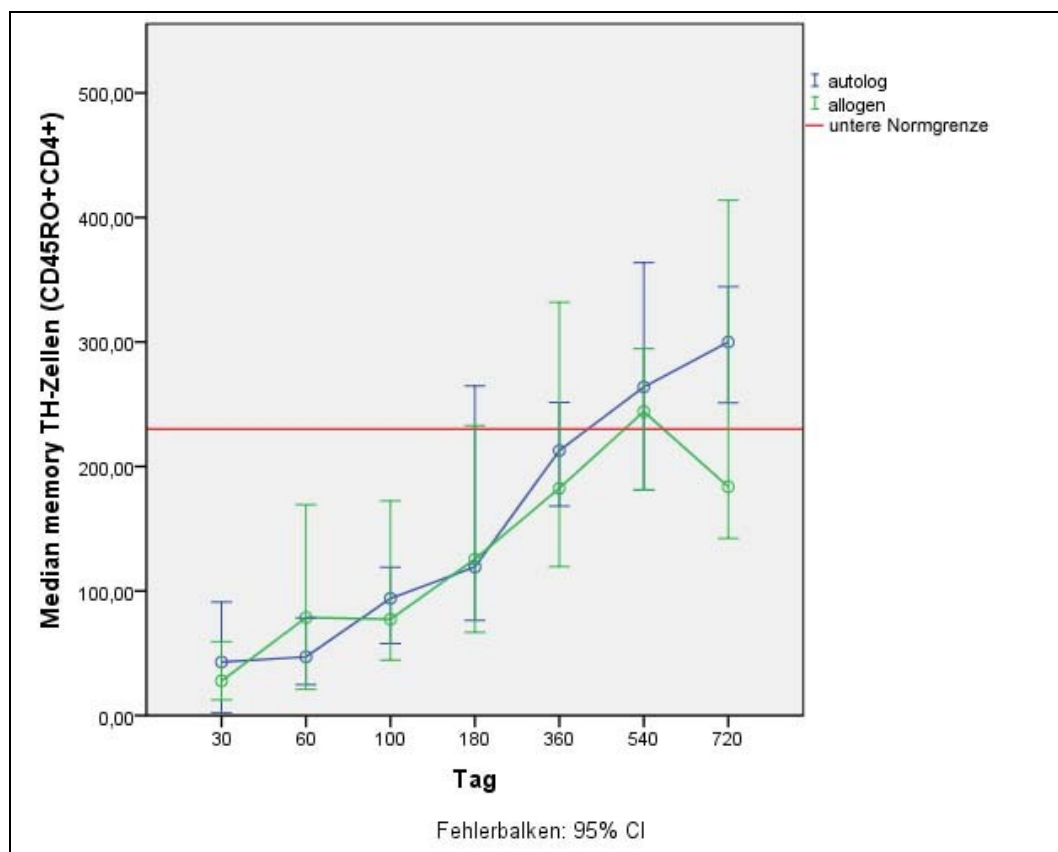


Abbildung 19: Immunrekonstitution der memory TH-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation.

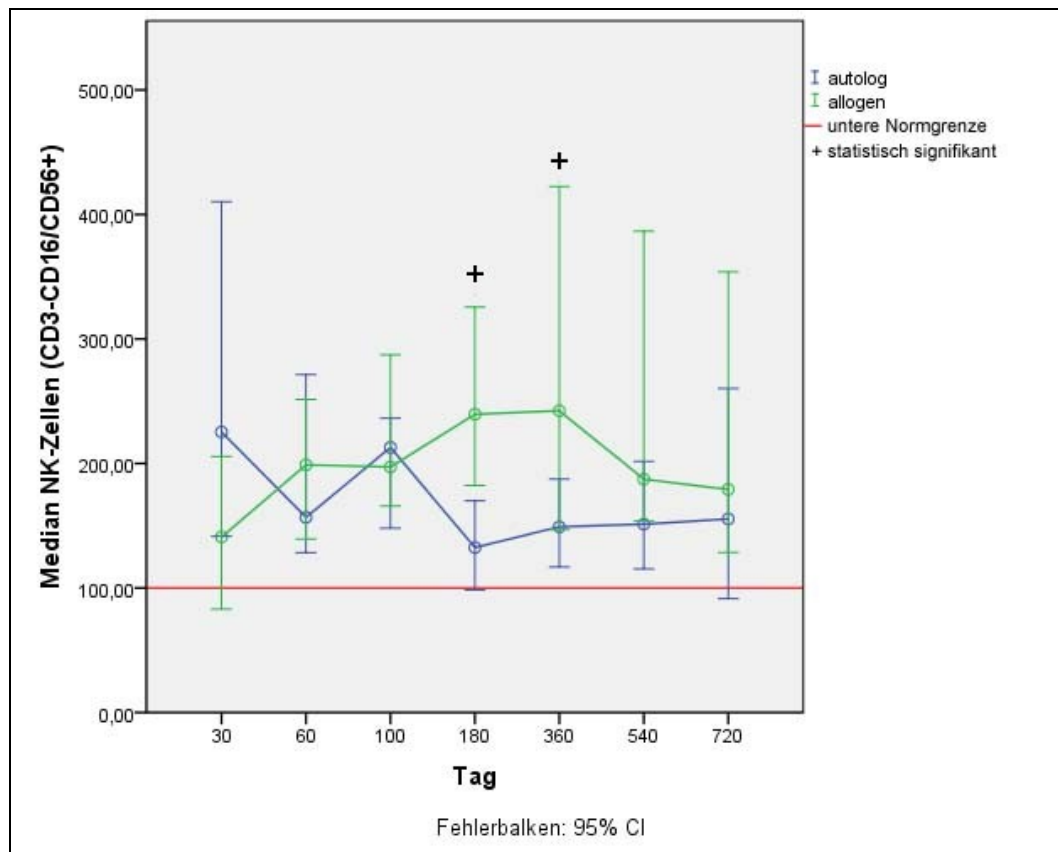


Abbildung 20: Immunrekonstitution der NK-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation.

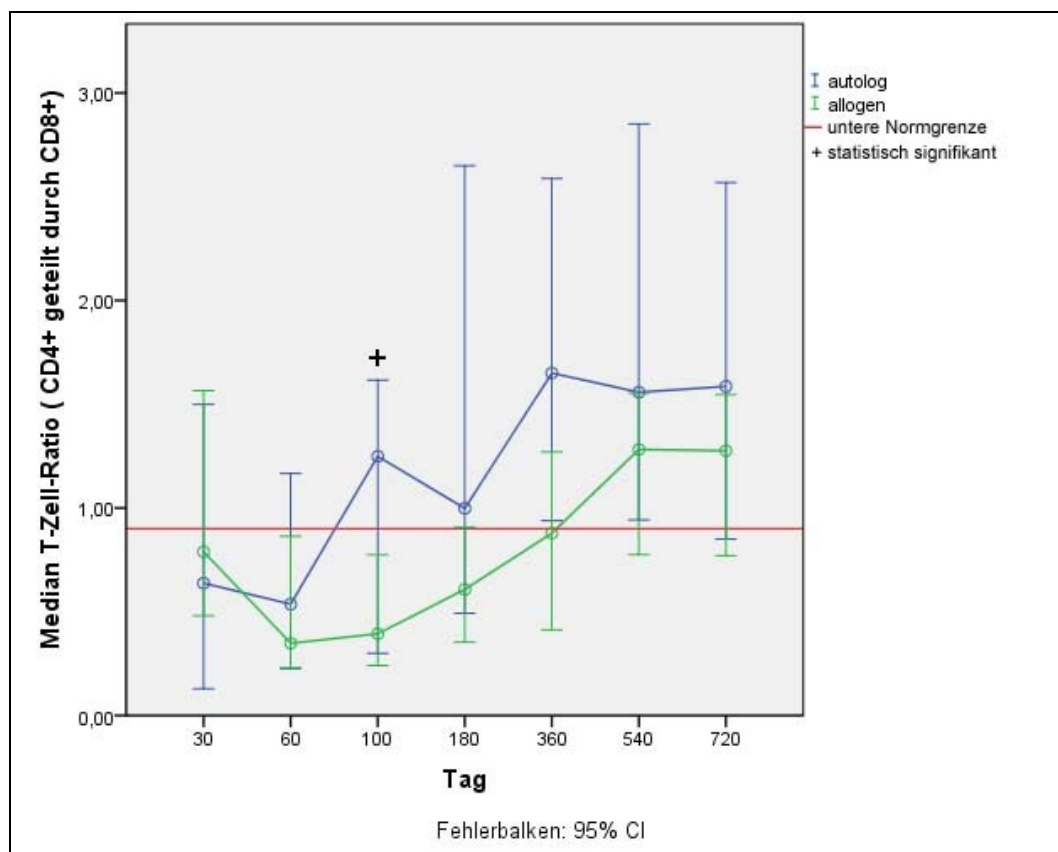


Abbildung 21: Immunrekonstitution der T-Zell-Ratio nach autologer versus allogener Transplantation.

### **5.3 Vergleich CD34+ selektionierte und unselektionierte periphere Blutstammzellen**

Von den insgesamt 39 Patienten, denen PBSZ transplantiert wurden, erhielten 19 Patienten (24 %) unselektionierte Stammzellen und 20 Patienten (25 %) CD34+ selektionierte Stammzellen.

Ähnlich wie im vorhergehenden Vergleich war eine weiterführende Homogenisierung der Gruppen hinsichtlich autologer bzw. allogener Transplantation aus statistischen Gründen nicht möglich, auch hier wären die Gruppen dann zu klein gewesen, um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

Vergleicht man die Kurvenverläufe beider Gruppen, zeigen sich vor allem zu Beginn des beobachteten Zeitraums (Tag 30) statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der T-,TH- und zytotoxischen T-Zell-Population hinsichtlich eines schnelleren Anstiegs der Gruppe, die unselektionierte PBSZ erhielt. An Tag 60 bleibt der signifikante Unterschied in der TH-Zell-Population erhalten, des Weiteren ergibt sich nun auch eine signifikant höhere Zellzahl innerhalb der memory-TH-Zellen bei der Gruppe der unselektionierten PBSZ.

Ein Jahr nach HSZT kommt ein umgekehrter Effekt zum Tragen, hier weist nun die Gruppe der CD34+ selektierten PBSZ statistisch signifikant höhere Zellzahlen auf, genauer in der Population der naiven TH-Zellen sowie der TH-Zellen.

Trotz fehlender statistischer Signifikanz zu späteren Zeitpunkten ist dieses Phänomen ebenso bei der Population der memory TH-Zellen zu beobachten, bis Tag 360 liegt die Kurve der Gruppe der unselektierten PBSZ über derjenigen der Gruppe der CD34+ selektierten PBSZ. Danach kreuzen sich die Kurven und die Gruppe der CD34+ selektierten PBSZ weist höhere Werte auf.

In der Population der B-Zellen zeigt sich ein genau umgekehrter Effekt, hier befindet sich zu Anfang des beobachteten Zeitraums die Kurve der CD34+ selektierten PBSZ über derjenigen der Gruppe der unselektierten PBSZ und beide Kurven kreuzen sich ab Tag 360.

Hinsichtlich der unteren Normwertgrenze sind wiederum Unterschiede in der TH- und naiven TH-Zell-Population zu vermerken. Hier erreicht die Gruppe der CD34+ selektierten PBSZ die untere Normgrenze bereits ab Tag 360, die Gruppe der unselektierten PBSZ erst ab Tag 540. Der größte Unterschied zeigt sich jedoch in der T-Zell-Ratio, wo sich die CD34+ selektierte Gruppe bereits ab Tag 100 über

der unteren Normwertgrenze befindet, die Gruppe der unselektionierten PBSZ hingegen diese erst ab Tag 540 überschreitet.

Die Gruppen aller anderen Zellpopulationen erreichen zeitgleich die untere Normwertgrenze.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass vor allem innerhalb der TH- und der naiven TH-Zellen direkt nach der HSZT die Gruppe der unselektionierten PBSZ einen schnelleren bzw. im Fall der naiven TH-Zellen nahezu identischen Anstieg zeigt, im weiteren Verlauf jedoch die Gruppe der CD34+ selektionierten PBSZ höhere Zellzahlen aufweist und auch die untere Normgrenze schneller erreicht.

Tabelle 15: Übersicht über die statistisch signifikanten Unterschiede mit p-Wert (Wilcoxon-Mann-Whitney) im Vergleich der Immunrekonstitution nach Transplantation von CD34+ selektionierten und unselektionierten PBSZ.

<b>Zellpopulation</b>	<b>Tag</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Art des Unterschieds</b>
T-Zellen	30	0,036	unselektioniert > CD34+
TH-Zellen	30	0,033	unselektioniert > CD34+
	60	0,003	unselektioniert > CD34+
	360	0,044	CD34+ > unselektioniert
zytotoxische T-Zellen	30	0,044	unselektioniert > CD34+
naive TH-Zellen	360	0,023	CD34+ > unselektioniert
memory TH-Zellen	60	0,017	unselektioniert > CD34+

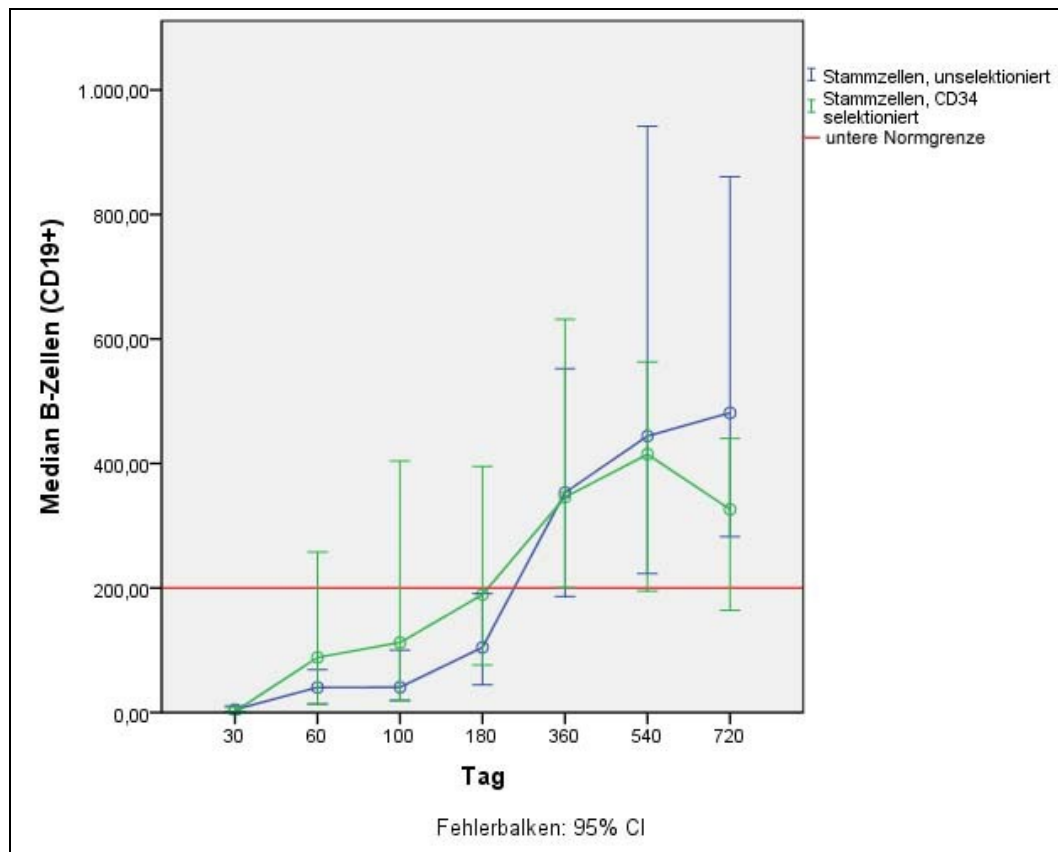


Abbildung 22: Immunrekonstitution der B-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ.

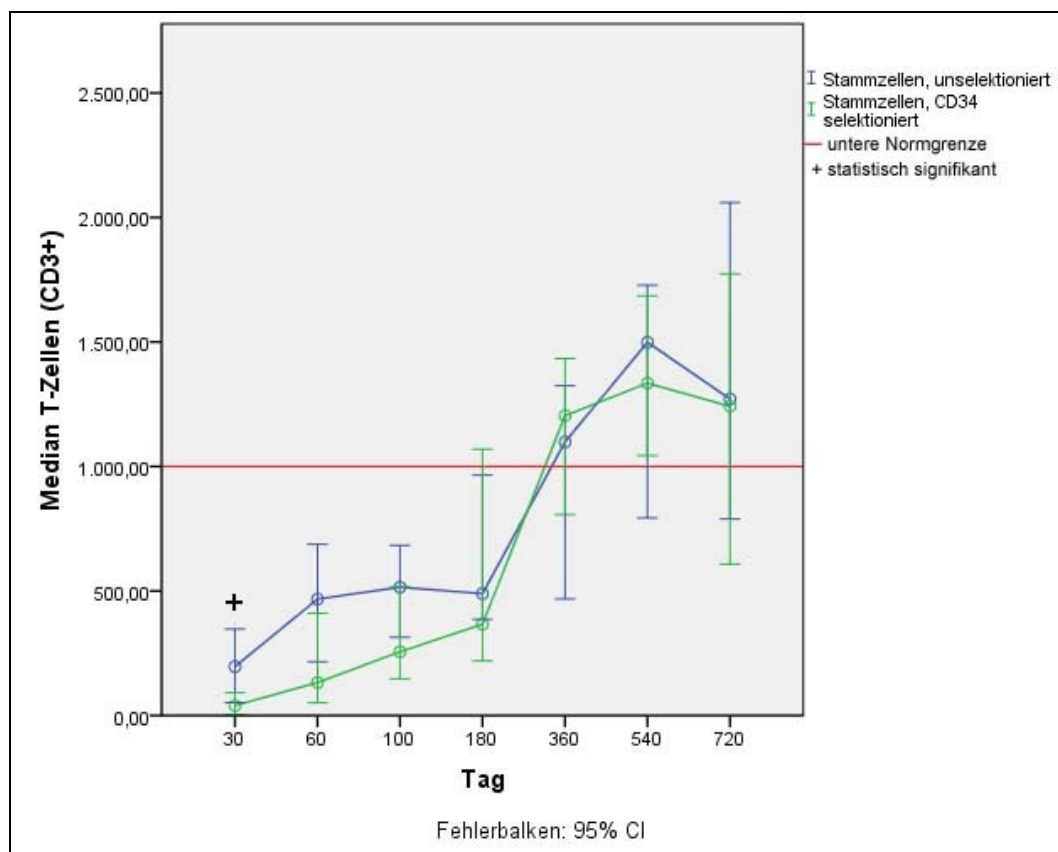


Abbildung 23: Immunrekonstitution der T-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ.

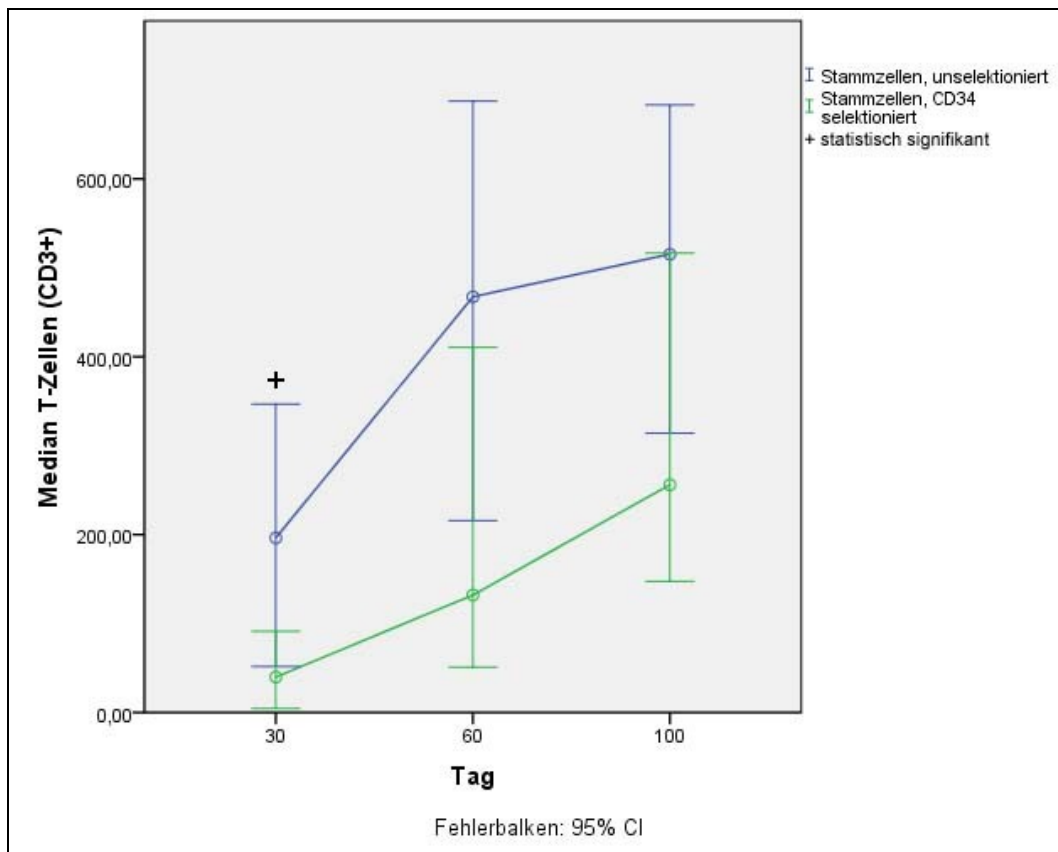


Abbildung 24: Immunrekonstitution der T-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ (Darstellung nur bis Tag 100).

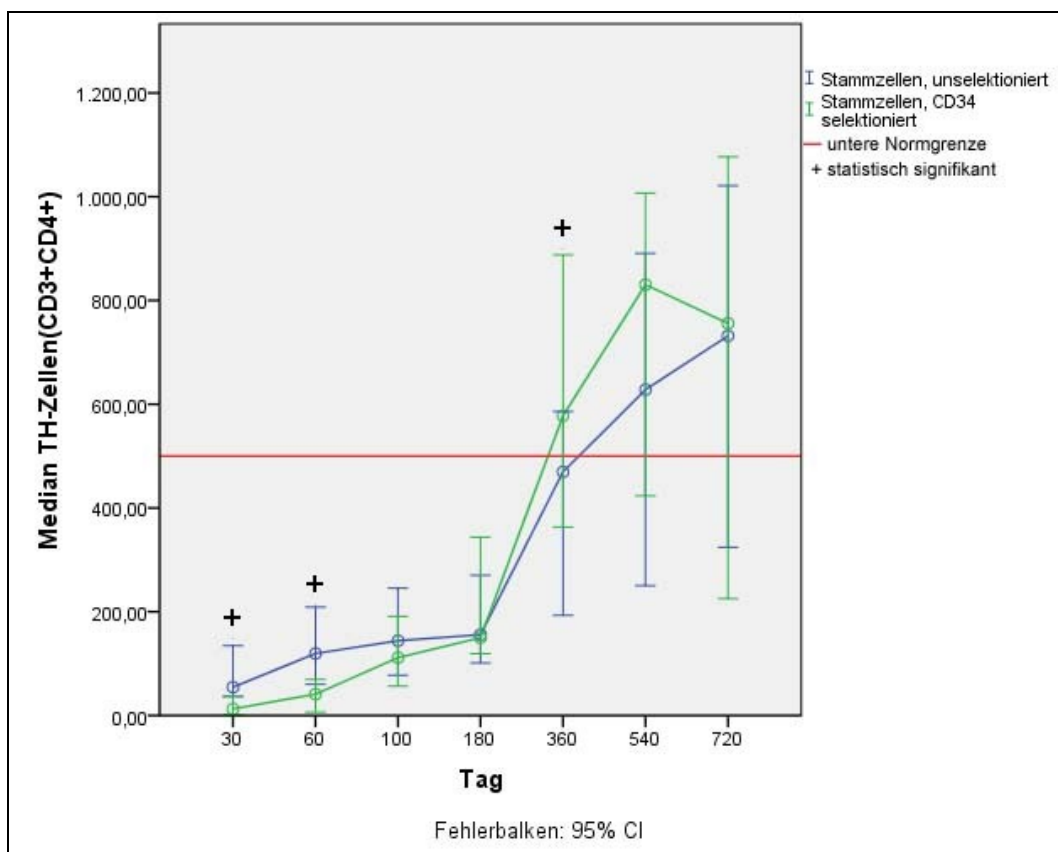


Abbildung 25: Immunrekonstitution der TH-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ.



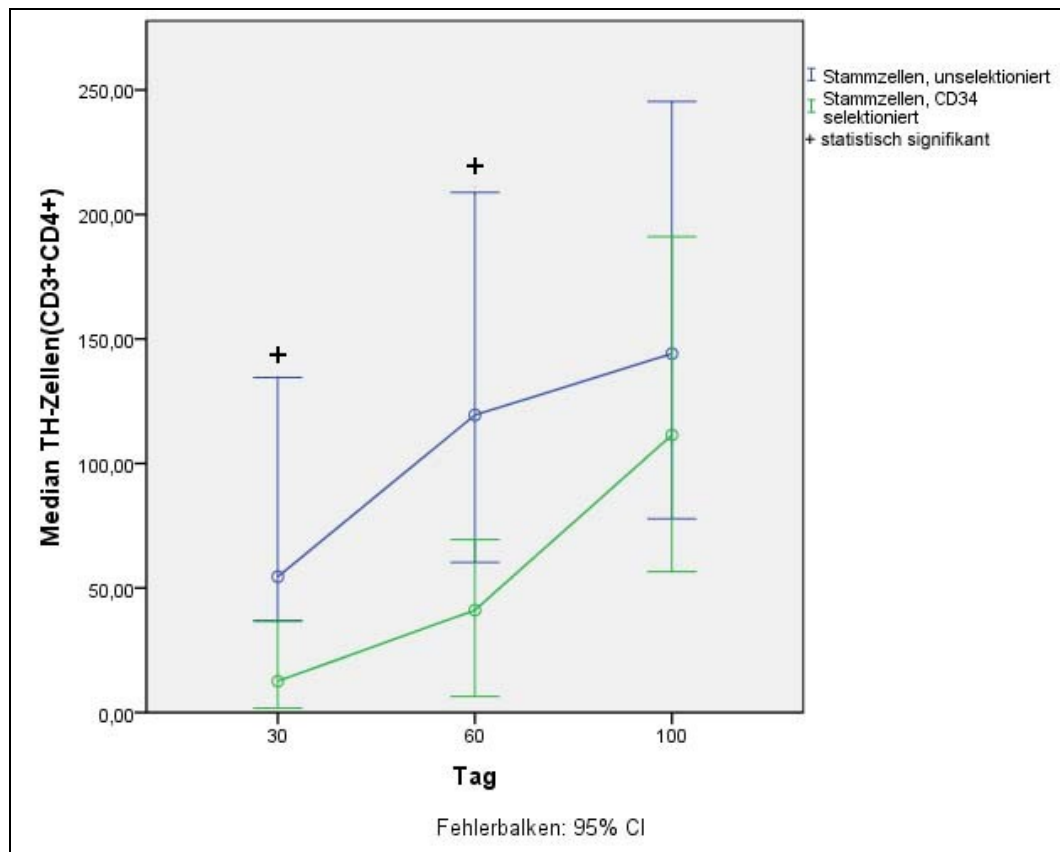


Abbildung 26: Immunrekonstitution der TH-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ (Darstellung nur bis Tag 100).

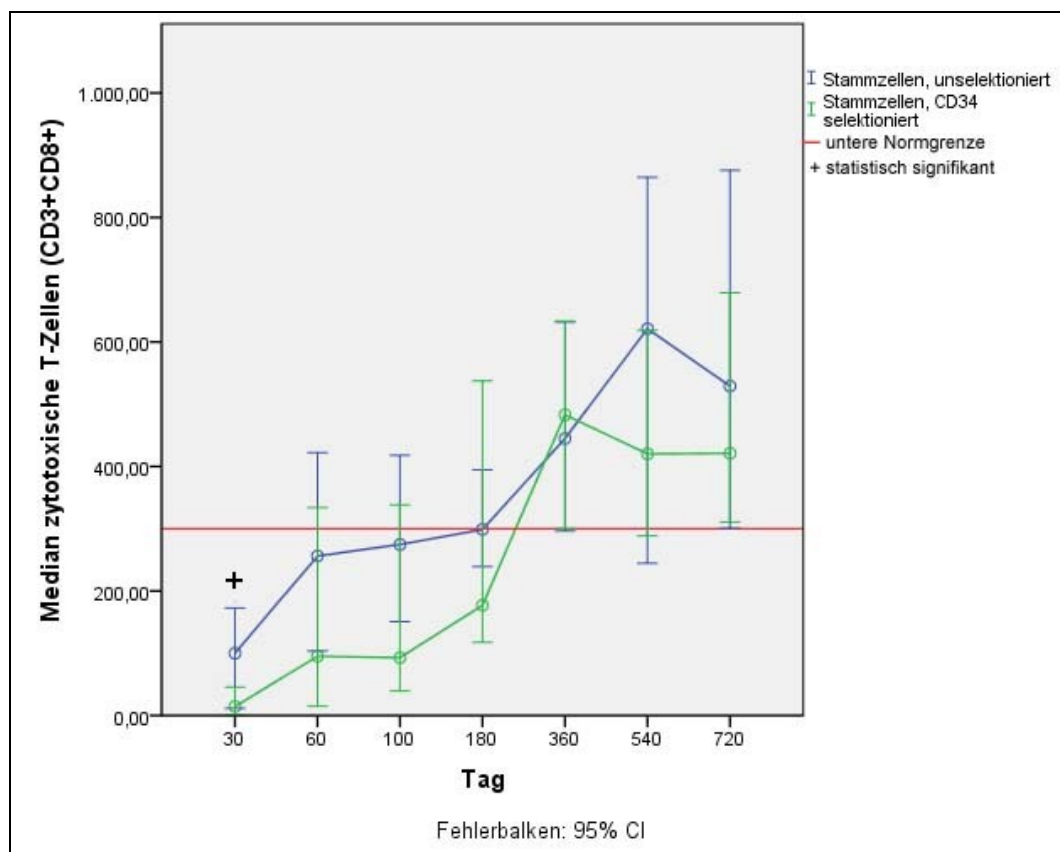


Abbildung 27: Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ.

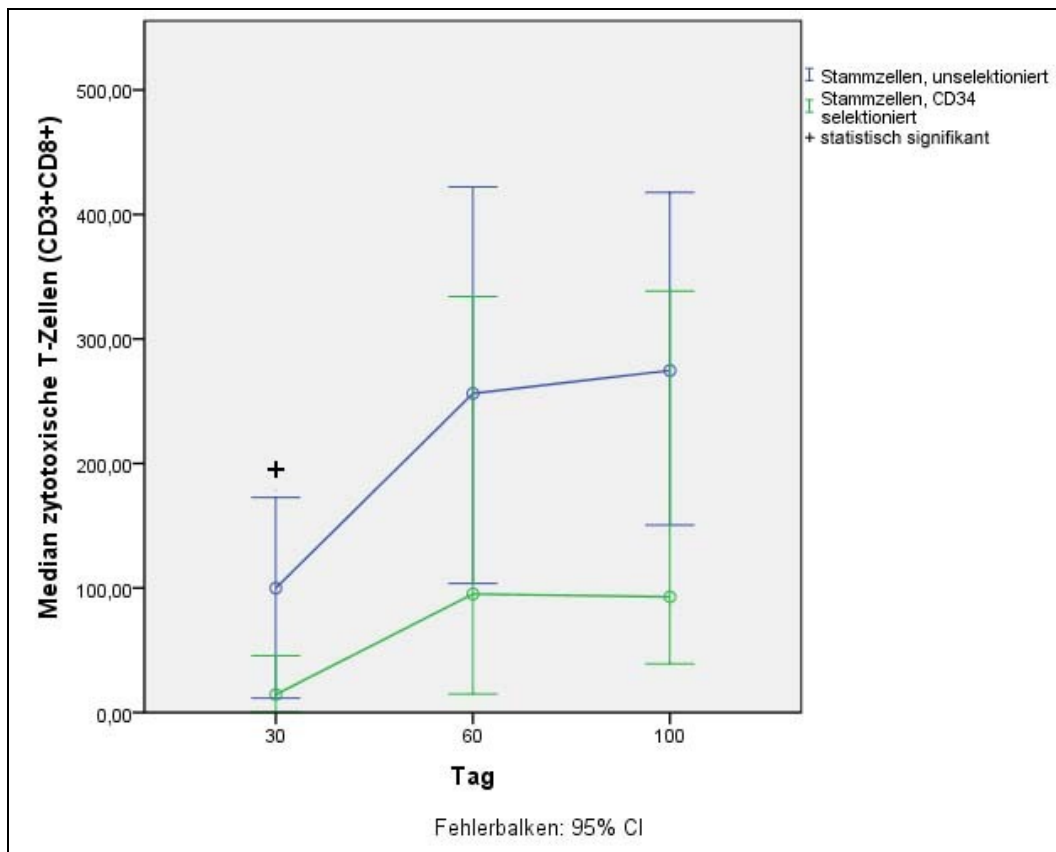


Abbildung 28: Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektierten versus unselektierten PBSZ (Darstellung nur bis Tag 100).

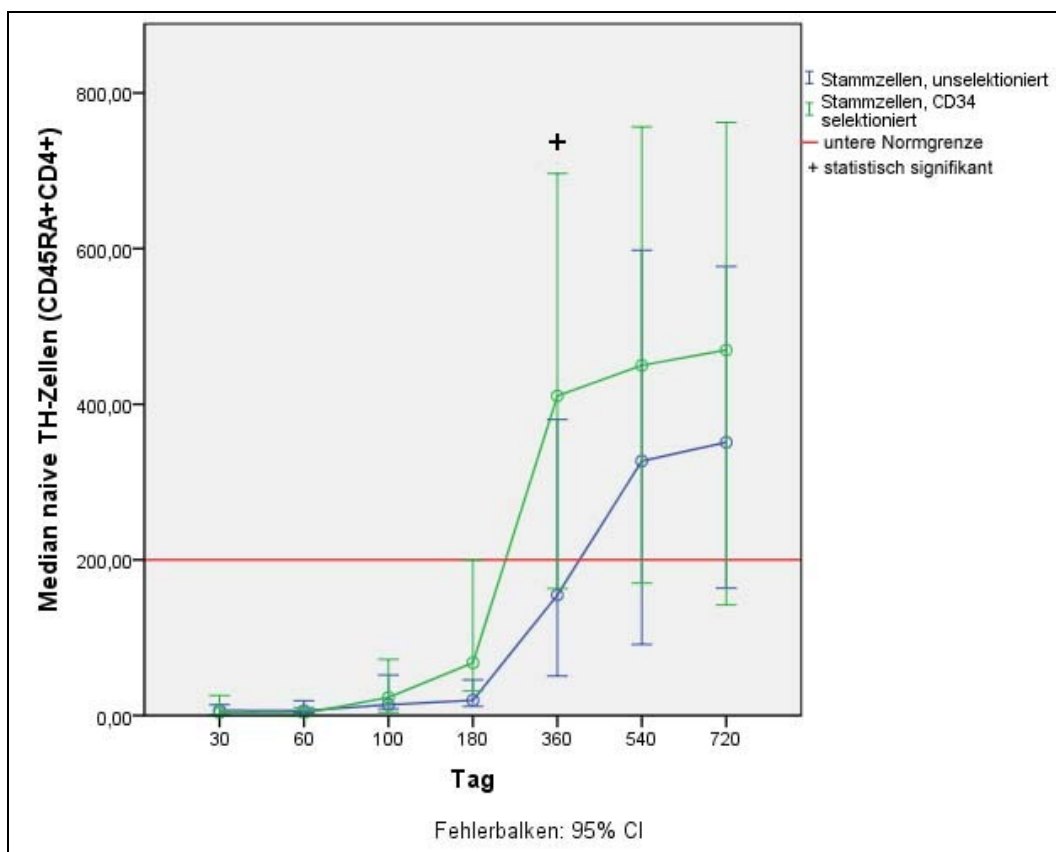


Abbildung 29: Immunrekonstitution der naiven TH-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektierten versus unselektierten PBSZ.

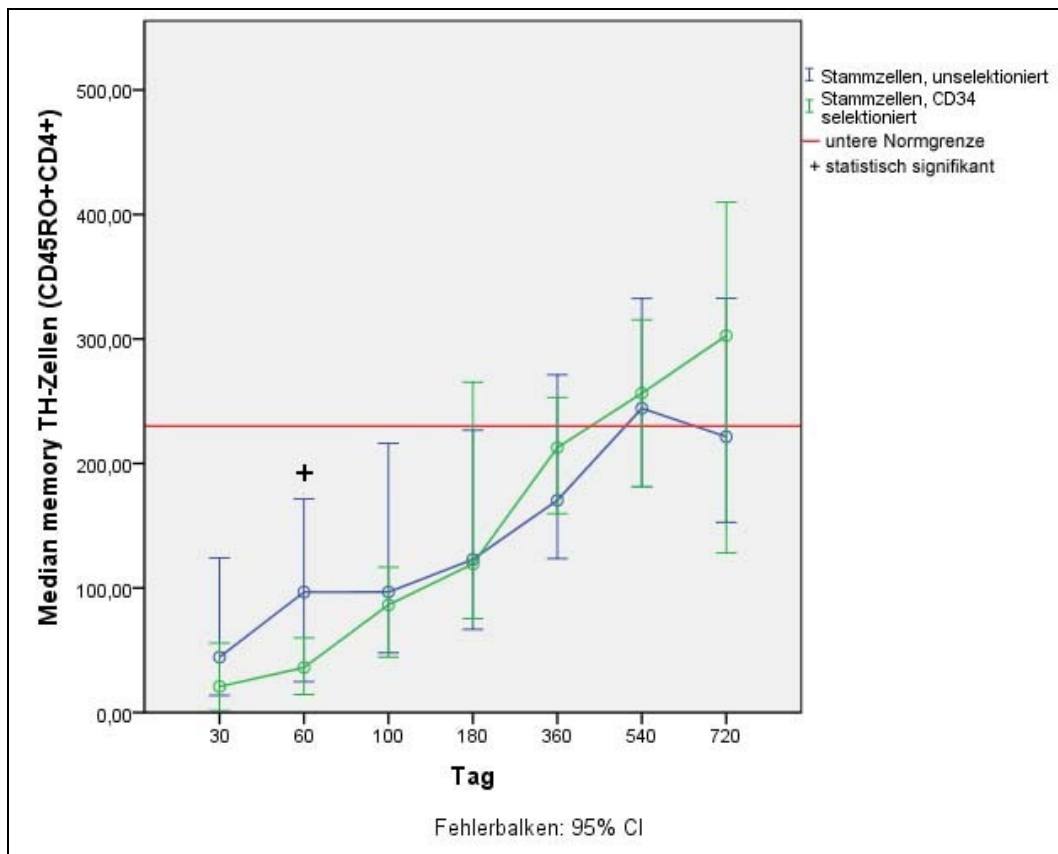


Abbildung 30: Immunrekonstitution der memory TH-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektierten versus unselektierten PBSZ.

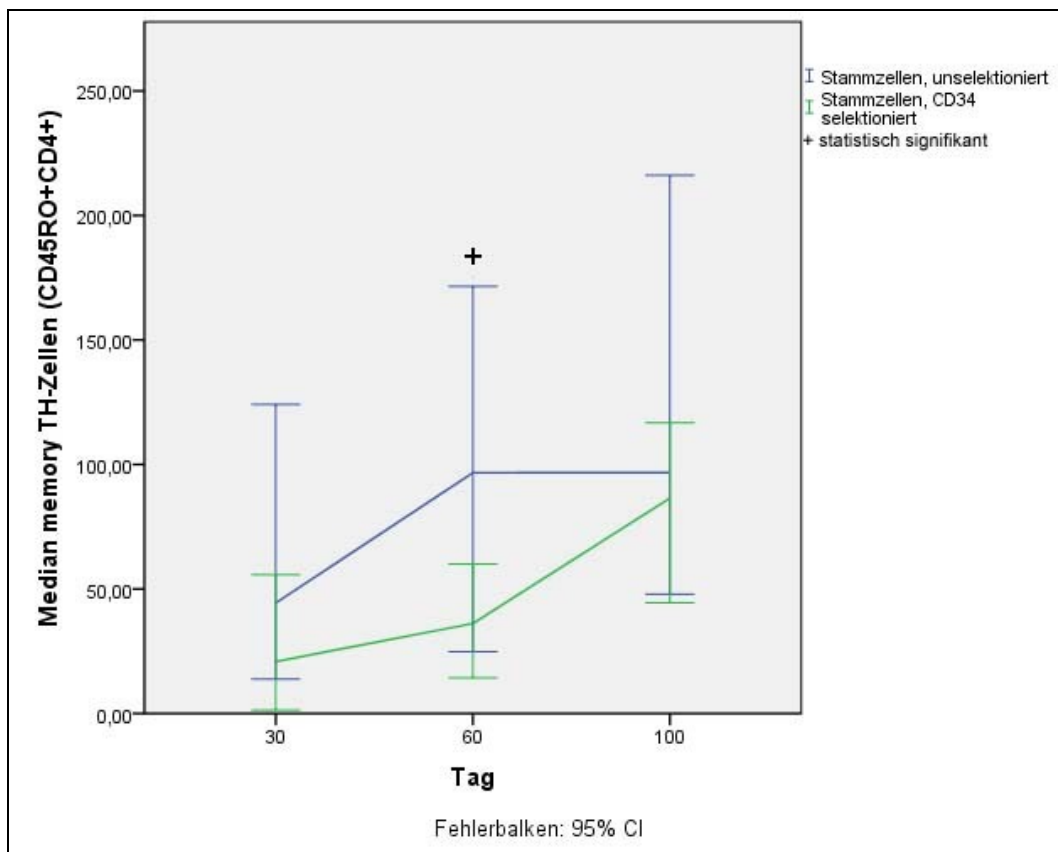


Abbildung 31: Immunrekonstitution der memory TH-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektierten versus unselektierten PBSZ (Darstellung nur bis Tag 100).

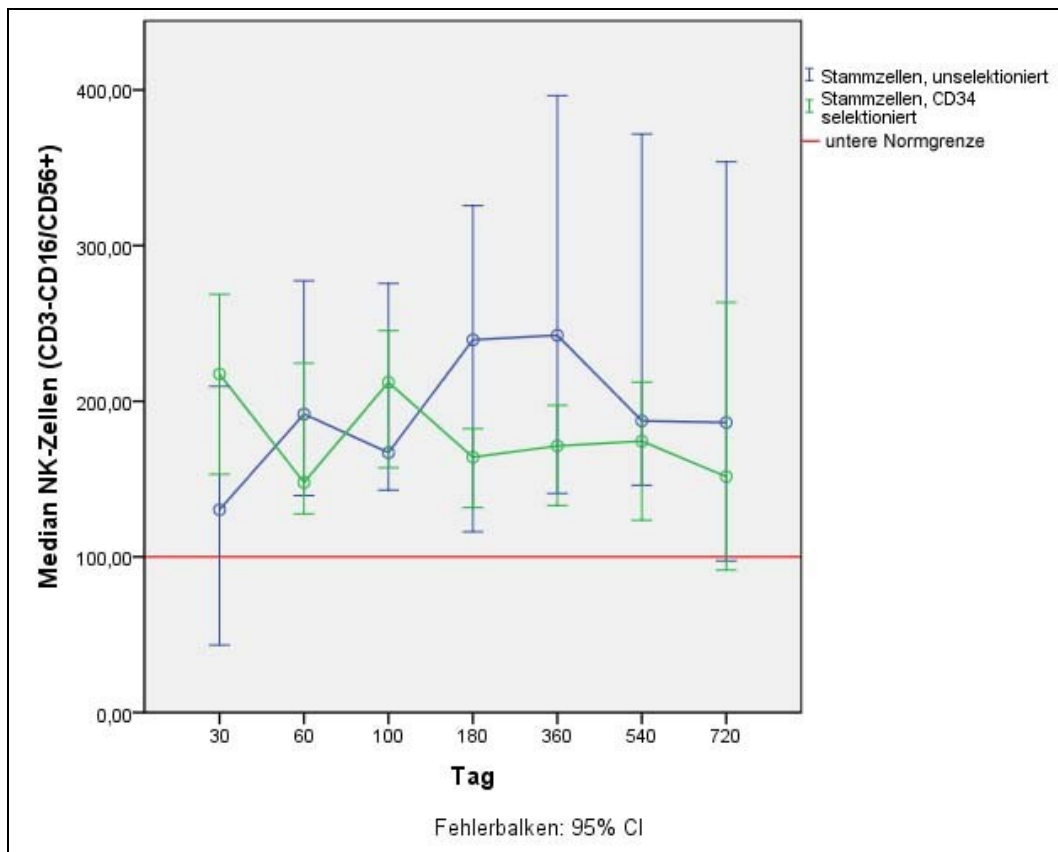


Abbildung 32: Immunrekonstitution der NK-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ.

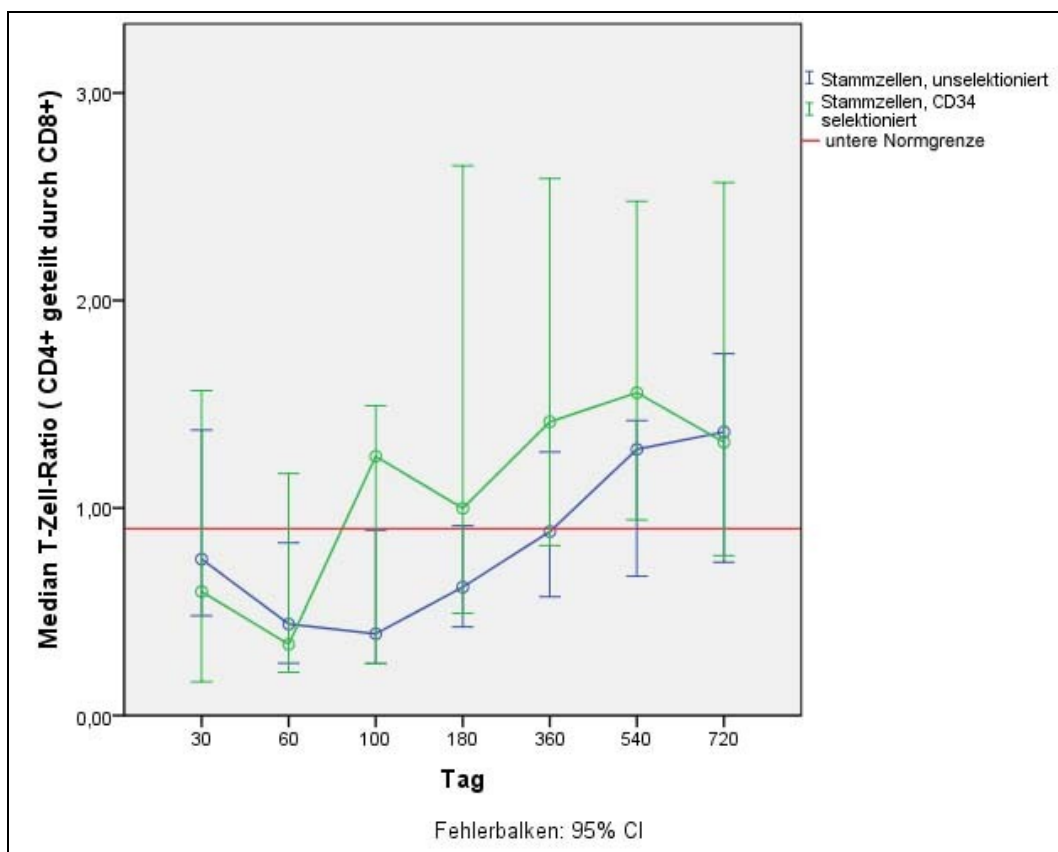


Abbildung 33: Immunrekonstitution der T-Zell-Ratio nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ.

## 5.4 Vergleich KM mit und ohne Konditionierung durch ATG

Um den Einfluss des ATG auf die Immunrekonstitution zu untersuchen, wurden die insgesamt 39 Patienten, denen KM transplantiert wurde, aufgeteilt in 20 Patienten (25 %), die zur Konditionierung ATG erhielten und 19 Patienten (24 %), die kein ATG erhielten.

Beide Gruppen sind somit homogen bezüglich der Stammzellquelle (KM) sowie der Art der Transplantation (allogen).

Im Vergleich der Gruppen zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede in der Population der naiven TH-Zellen und der T-Zell-Ratio. Innerhalb ersterer besteht der Unterschied darin, dass die Gruppe ohne ATG an den Tagen 30-100 signifikant höhere Zellzahlen aufweist als die Gruppe mit ATG. Bei der T-Zell-Ratio bleibt der signifikante Unterschied sogar bis Tag 360 bestehen, hier also eine höhere Ratio in der Gruppe ohne ATG. Dieser Umstand spiegelt sich auch in den Kurvenverläufen der TH- und der zytotoxischen T-Zellen wider, aus welchen die T-Zell-Ratio bestimmt wird. In der Population der TH-Zellen liegt die Kurve der Gruppe ohne ATG über den gesamten Zeitraum hinweg über derjenigen der Gruppe mit ATG, jedoch ohne statistische Signifikanz. Bei den zytotoxischen T-Zellen verhält es sich genau umgekehrt, hier weist die Gruppe mit ATG höhere Zellzahlen auf, und das ebenso ohne statistische Signifikanz. Zusammenfassend kann man also feststellen, dass die T-Zell-Ratio einen in den absoluten Zellzahlen bereits angedeuteten Trend statistisch verifiziert.

Die übrigen Zellpopulationen, also B-, T-, memory TH- und NK-Zellen, zeigen einen nahezu identischen Kurvenverlauf mit gleichzeitigem Erreichen der unteren Normgrenze.

Unterschiede bezüglich der unteren Normwertgrenze finden sich wiederum innerhalb der Population der naiven TH-Zellen sowie bei der T-Zell-Ratio. Hier erreicht jeweils die Gruppe ohne ATG die untere Norm eher als die Gruppe mit ATG.

In der Population der zytotoxischen T-Zellen erreicht die Gruppe mit ATG die Normgrenze bereits ab Tag 60, die Gruppe ohne ATG erst ab Tag 360.

Tabelle 16: Übersicht über die statistisch signifikanten Unterschiede mit p-Wert (Wilcoxon-Mann-Whitney) im Vergleich der Immunrekonstitution nach Transplantation von KM mit und ohne Konditionierung durch ATG.

Zellpopulation	Tag	p-Wert	Art des Unterschieds
naive TH-Zellen	30	0,001	ohne ATG > mit ATG
	60	0,006	ohne ATG > mit ATG
	100	0,002	ohne ATG > mit ATG
T-Zell-Ratio	30	0,040	ohne ATG > mit ATG
	60	0,001	ohne ATG > mit ATG
	100	0,013	ohne ATG > mit ATG
	180	0,002	ohne ATG > mit ATG
	360	0,049	ohne ATG > mit ATG

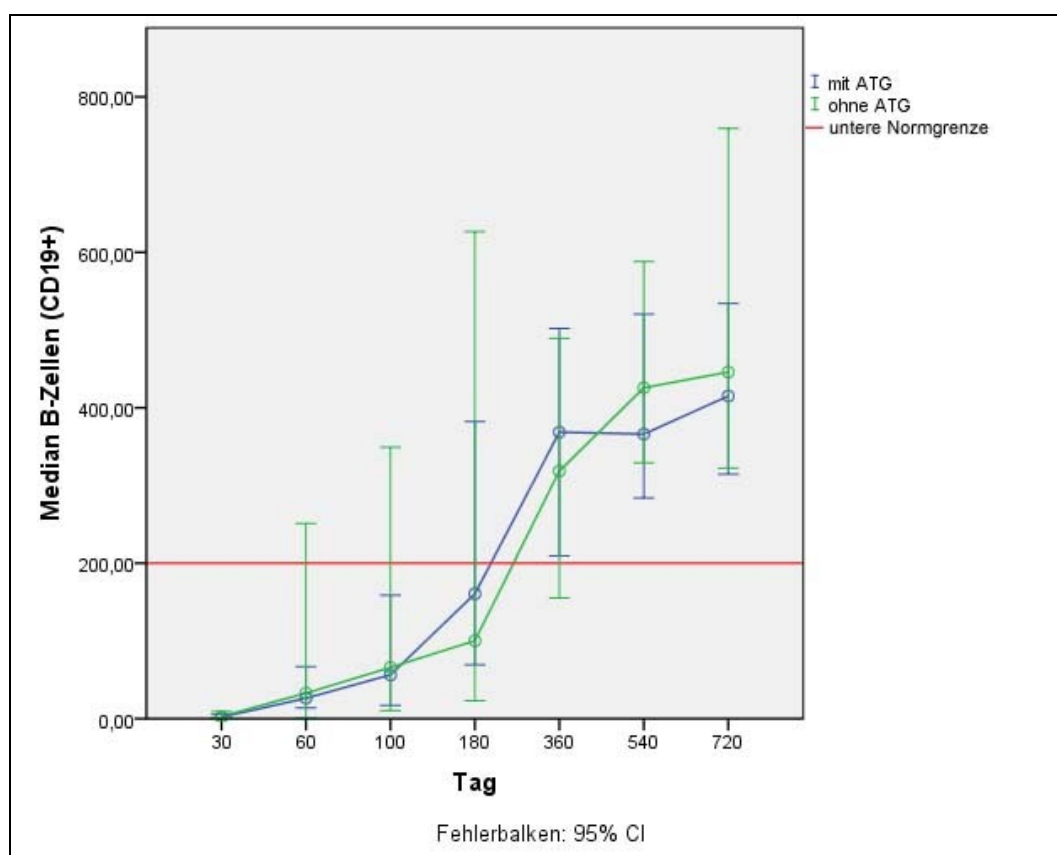


Abbildung 34: Immunrekonstitution der B-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG.

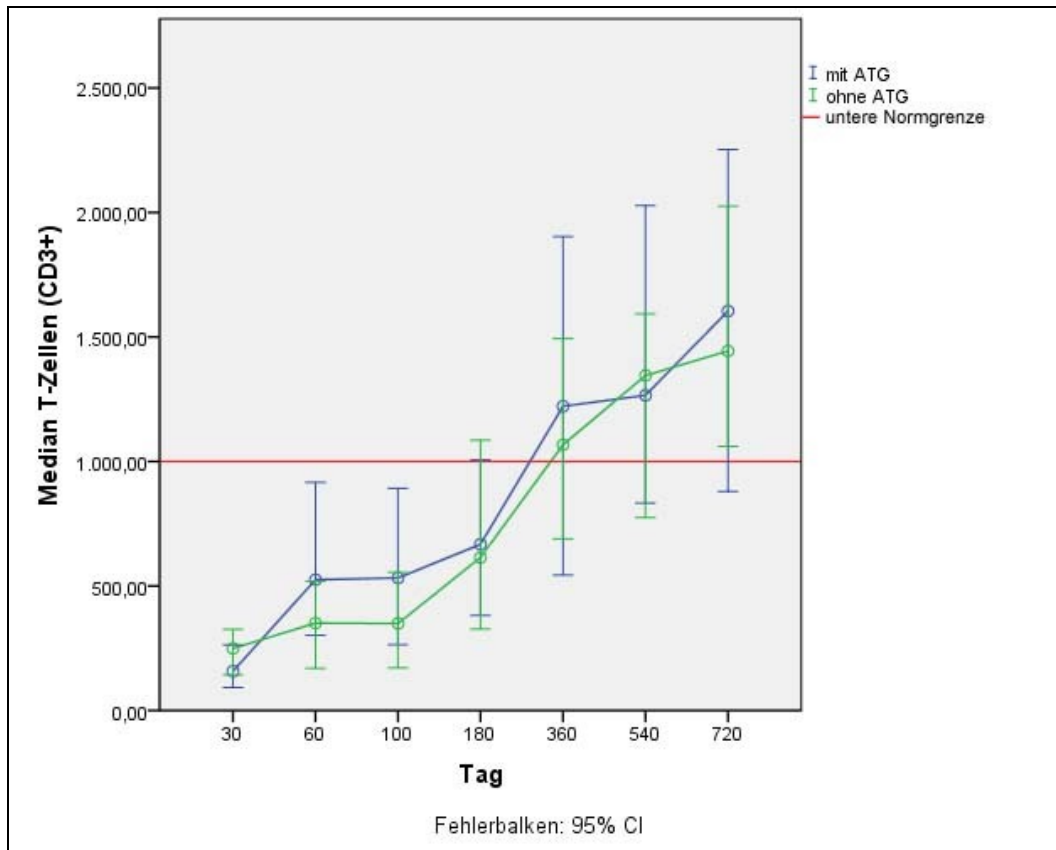


Abbildung 35: Immunrekonstitution der T-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG.

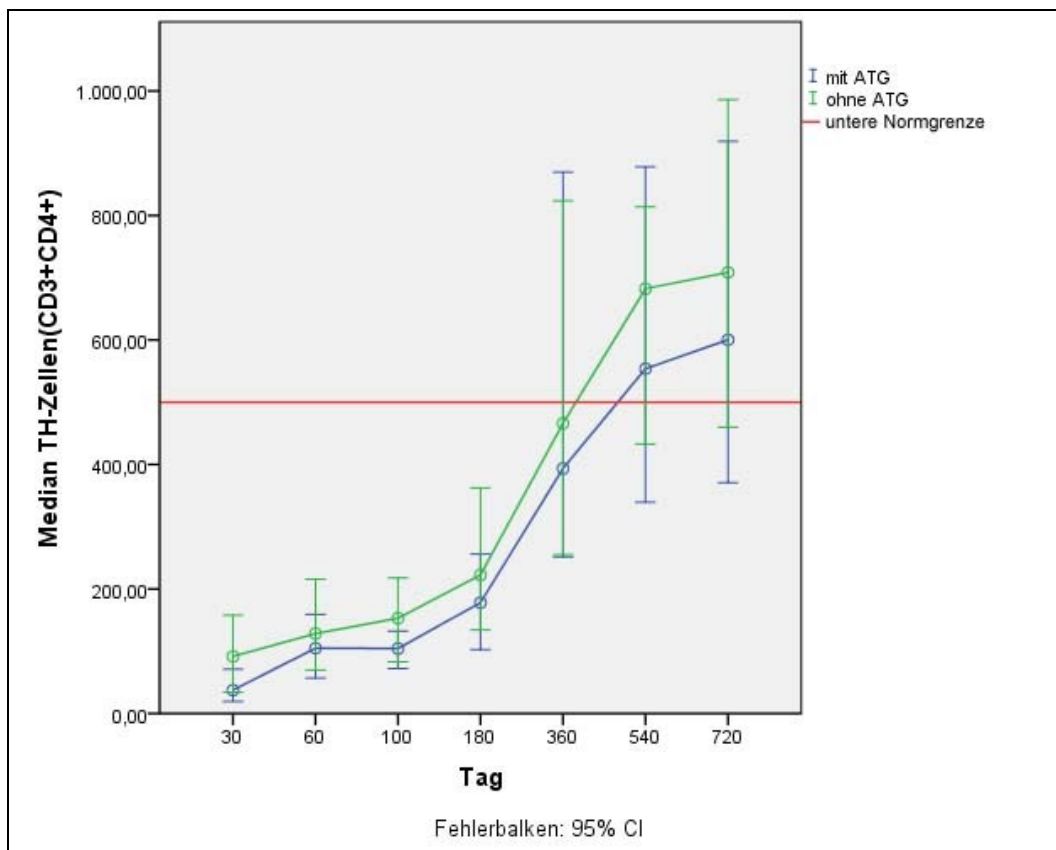


Abbildung 36: Immunrekonstitution der TH-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG.

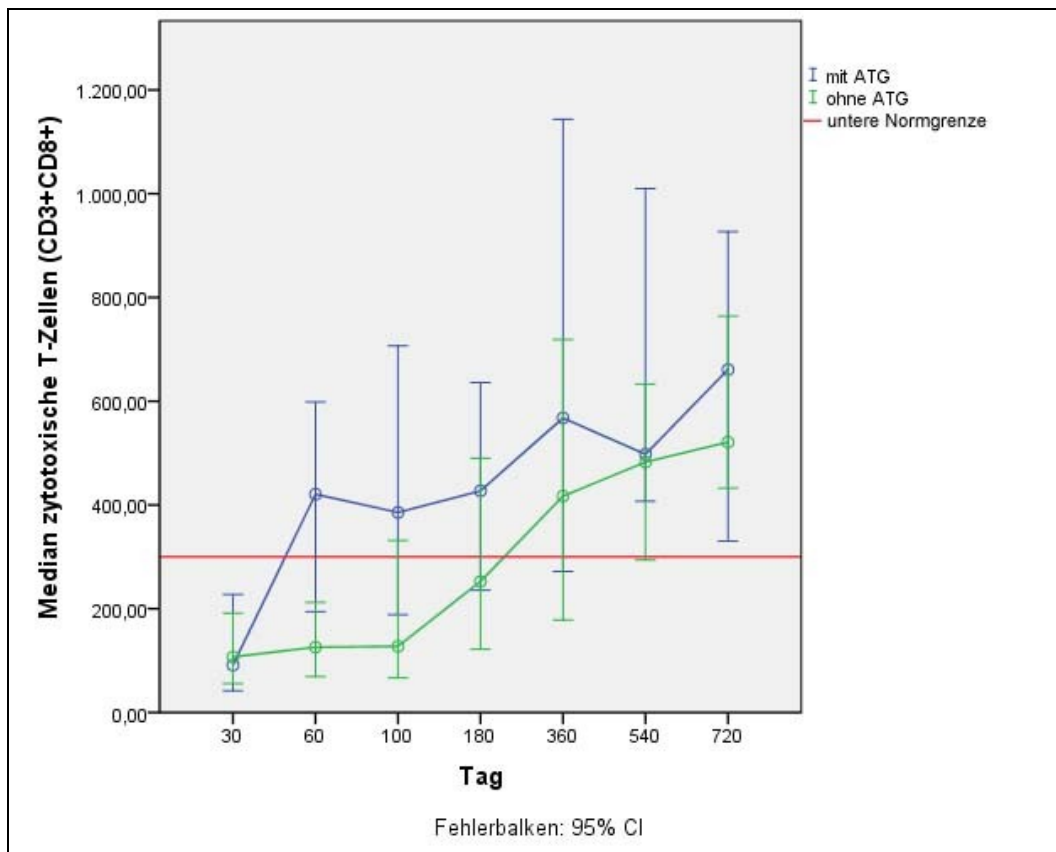


Abbildung 37: Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG.

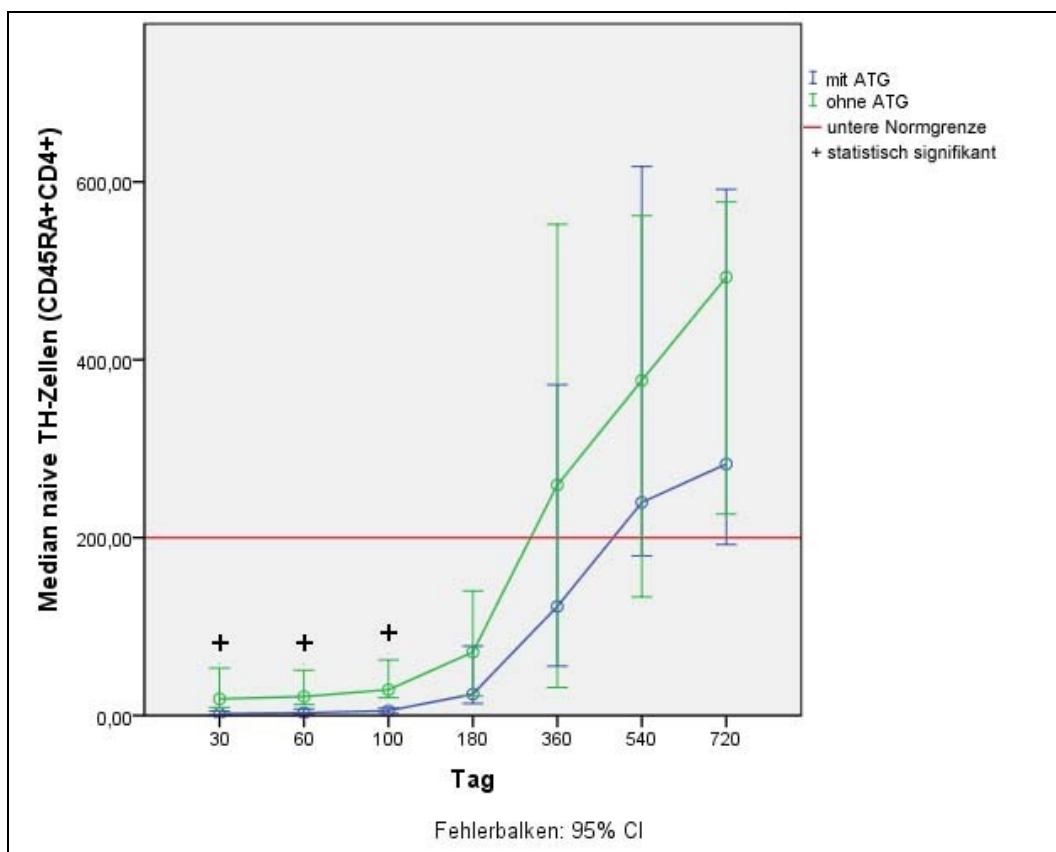


Abbildung 38: Immunrekonstitution der naiven TH-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG.



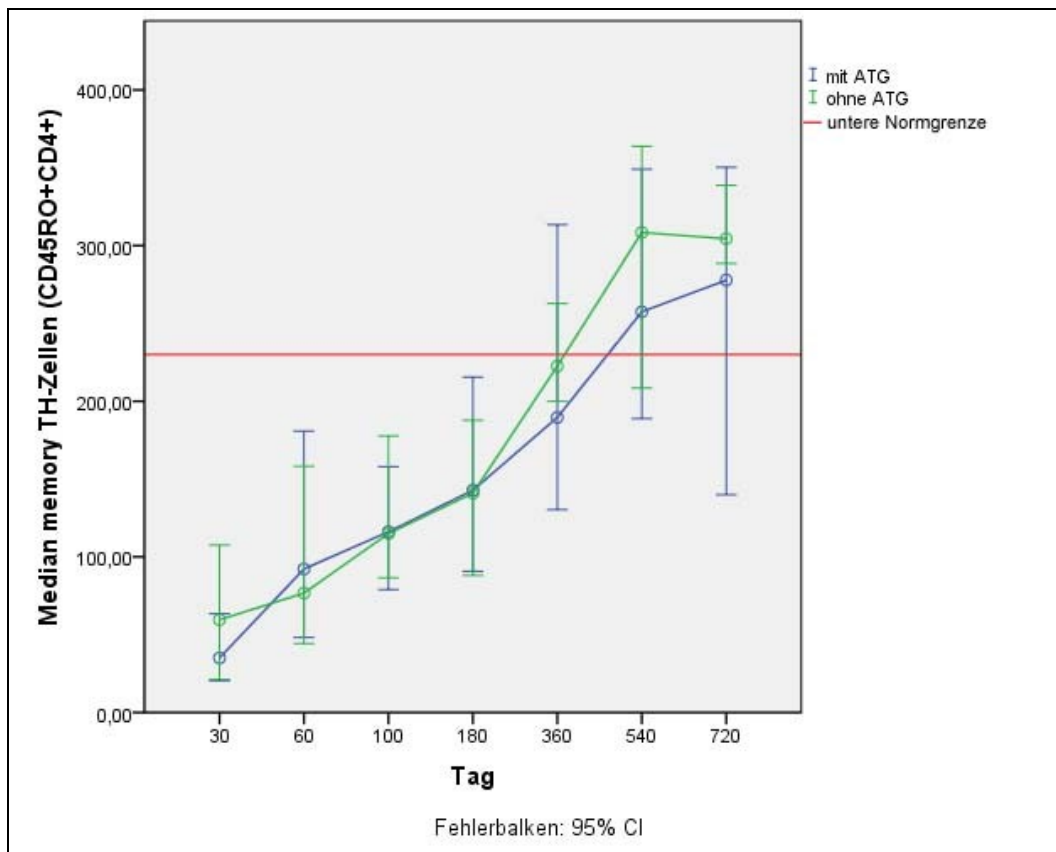


Abbildung 39: Immunrekonstitution der memory TH-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG.

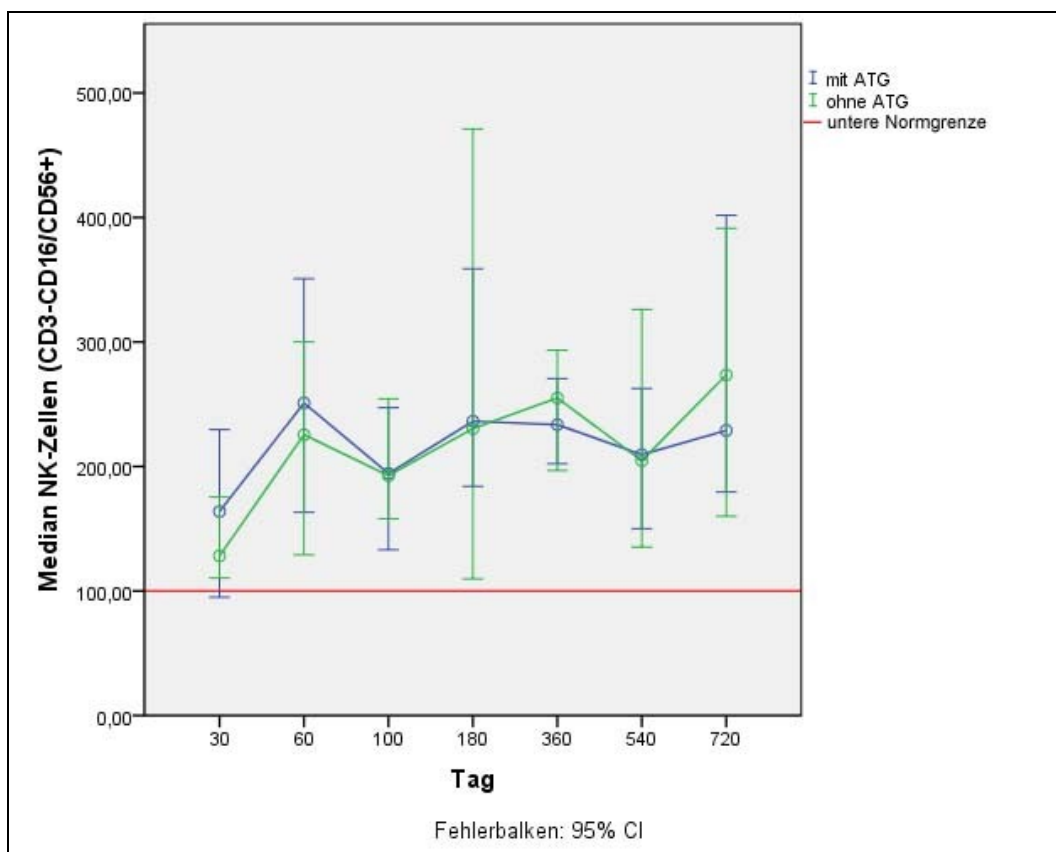


Abbildung 40: Immunrekonstitution der NK-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG.

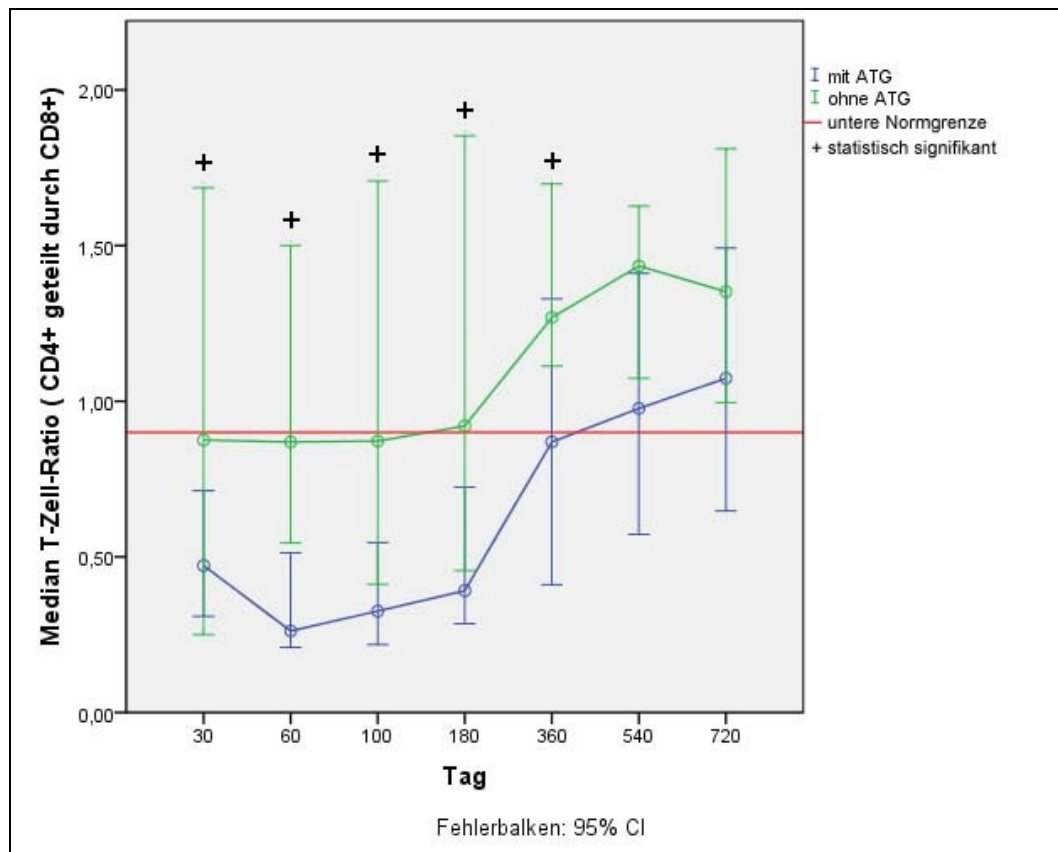


Abbildung 41: Immunrekonstitution der T-Zell-Ratio nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Inhaltliche Diskussion**

Die Immunrekonstitution nach HSZT ist für den klinischen Verlauf und die Prognose der Patienten von großer Bedeutung. Sie ist daher Gegenstand intensiver klinischer Forschung.

Von entscheidendem Interesse ist dabei die Frage, unter welchen Bedingungen die Immunrekonstitution beschleunigt werden kann. Je eher die immunologischen Zellen ihre volle Funktionsfähigkeit erreicht haben, desto besser ist die Prognose der Patienten. Schwerwiegende Infektionen nach HSZT stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit einer verzögerten Immunrekonstitution (Storek et al. 2001) und sind neben der Abstoßungsreaktion der wichtigste therapielimitierende Faktor (Ochs et al. 1995).

Dabei verläuft die Immunrekonstitution in mehreren Schritten. Zunächst sind direkt die transplantierten Spenderzellen verantwortlich für die Immunabwehr nach HSZT, erst im weiteren Verlauf entstehen durch Teilung der pluripotenten Stammzellen neue Generationen von immunologischen Zellpopulationen, die dann noch später im zeitlichen Verlauf reifen und ihre volle Funktionsfähigkeit entfalten. Dieser Prozess ist vor allem abhängig von der thymusabhängigen Reifung der T-Zellen, welche ihrerseits dann wieder die Reifung der B-Zellen stimulieren (Geddes et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob und inwiefern die Stammzellquelle, die Art der Transplantation (autolog oder allogene), die CD34+ Selektionierung oder die Konditionierung mit ATG einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Immunrekonstitution haben.

### 6.1.1 Einfluss der Stammzellquelle

Im ersten Versuch der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss der Stammzellquelle untersucht und damit der Frage nachgegangen, ob die Verwendung von KM oder PBSZ einen Unterschied in der Immunrekonstitution bewirkt.

In der Literatur lassen sich hierzu verschiedene Ergebnisse finden.

Einige Forschungsgruppen postulieren einen klaren Vorteil bei der Transplantation von PBSZ. Hier sei generell die Immunrekonstitution schneller, bei Differenzierung der verschiedenen Zellpopulationen weisen vor allem die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen neben T-Zellen und B-Zellen signifikant höhere Zellzahlen auf (Koehne et al. 1997, Ottinger et al. 1996, Storek et al. 2001). Dieses Ergebnis wird dann auch auf klinische Beobachtungen ausgeweitet, da nach Transplantation von PBSZ signifikant weniger Infektionen beobachtet wurden (Storek et al. 2001). Grund dafür ist nach Meinung der Autoren zum einen, dass ein PBSZ-Transplantat eine 17-fach höhere Zahl an T-Helferzellen beinhaltet als ein KM-Transplantat, und zum anderen, dass diese Zellen auch lange Zeit im Empfänger überleben und somit direkt zur Immunrekonstitution beitragen (Ottinger et al. 1996).

Andere, jüngere Forschungen konnten hingegen keinen signifikanten Unterschied in der Immunrekonstitution bei Transplantation von KM oder PBSZ nachweisen (Giannelli et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit zeigen sich nur punktuelle signifikante Unterschiede in der Immunrekonstitution im Vergleich der beiden Stammzellquellen. Somit lässt sich nur schwer ein eindeutiger Vorteil für eine Gruppe feststellen. Tatsächlich zeigen beide Kurven einen nahezu identischen Verlauf und die genannten Unterschiede fallen alle auf den Tag 30 nach HSZT.

Im Gegensatz zu den o.g. Ergebnisse aus den 1990er Jahren ist im Speziellen der Anstieg der T-Helferzellen nahezu kongruent in beiden Gruppen, die untere Normgrenze wird sogar in der KM-Gruppe etwas eher erreicht.

Der Grund für die genannten Unterschiede in den Ergebnissen im Vergleich der Immunrekonstitution nach Transplantation von KM oder PBSZ liegt sehr wahrscheinlich in dem Alter der jeweils beobachteten Patienten. In der vorliegenden

Arbeit und in der Publikation von Giannelli et al. waren die Patienten im Kindesalter, wohingegen in den anderen Forschungen erwachsene Patienten untersucht wurden.

Anscheinend ist die Immunrekonstitution im Kindesalter unabhängig von der Stammzellquelle, bei Erwachsenen jedoch kann die höhere T-Zell-Anzahl im PBSZ-Transplantat zu einer beschleunigten Immunrekonstitution beitragen.

Grund für die von der Stammzellanzahl unabhängigen Immunrekonstitution bei Kindern ist die im jüngeren Alter besser erhaltene Thymusfunktion, da die Reifung neuer T-Zellen nach HSZT im Thymus geschieht und damit abhängig von dessen Funktion ist (Cavazzano-Calvo et al. 2009). Mit steigendem Alter wird sukzessive das gesamte Thymusgewebe in Fettgewebe umgewandelt. Je jünger die Patienten zum Zeitpunkt der SZT sind, desto besser ist deren Thymusfunktion erhalten und desto effektiver findet die Immunrekonstitution statt (Seggewiss et al. 2010).

Des Weiteren haben andere Studien gezeigt, dass die absolute Anzahl an kernhaltigen Zellen im Transplantat einen Einfluss auf das Überleben der Patienten unabhängig von der eigentlichen Stammzellquelle hat (Russell et al. 1999). Es lässt sich daher vermuten, dass die schlechtere Immunrekonstitution bei Verwendung von KM in den Publikationen von Ottinger und Storek et al. einer geringen Zellzahl im Transplantat geschuldet ist und nicht der Stammzellquelle selbst.

Perspektivisch besteht die Möglichkeit, auch vor der Entnahme von KM

G-CSF zu applizieren, um die Zellzahl im KM-Transplantat zu erhöhen. Morton et al. zeigten ein gleichwertiges Anwachsen des Transplantats mit geringerer Inzidenz von GvHD bei Verwendung von G-CSF-mobilisiertem KM im Vergleich zu G-CSF-mobilisierten PBSZ (Morton et al. 2001). Viel versprechend ist auch der Vergleich zwischen der Transplantation von G-CSF-mobilisiertem KM und unbehandeltem KM, hier zeigt sich eine signifikant geringere Inzidenz von akuter GvHD bei signifikant höherer Anzahl von kernhaltigen Zellen im Transplantat der G-CSF-mobilisierten Gruppe (Ji et al. 2002).

### 6.1.2 Einfluss der Transplantationsart

Der zweite Vergleich untersucht den möglichen Einfluss einer allogenen oder autologen Transplantation auf die Immunrekonstitution.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich in der Population der T-Helferzellen und der naiven TH-Zellen ein signifikanter Vorteil in der Gruppe der autolog transplantierten Patienten vor allem im späteren zeitlichen Verlauf, also ab ½-1 Jahr nach HSZT. Auch die untere Normgrenze wird bei diesen beiden Zellpopulationen in der autologen Gruppe eher erreicht als in der allogenen Gruppe, also bereits ab Tag 360 statt ab Tag 540 in der Gruppe der allogenen transplantierten Patienten.

Noch deutlicher wird dieses Ergebnis in der T-Zell-Ratio, bei der ebenfalls in der autologen Gruppe signifikant höhere Werte erreicht werden und die untere Normgrenze bereits 9 Monate vor der allogenen Gruppe überschritten wird.

Ein genau gegenteiliges Ergebnis erbrachten die Forschungen von Schwinger et al., wo die Zahl der CD3+ T-Zellen in der Gruppe der autolog transplantierten Patienten im Zeitraum 3 – 6 Monate nach HSZT signifikant geringer war als in der allogenen Gruppe. Ein Jahr nach HSZT war bereits kein signifikanter Unterschied mehr zwischen beiden Gruppen nachzuweisen. In der Population der T-Helferzellen ließ sich zu keinem Zeitpunkt ein Vorteil für eine der beiden Gruppen feststellen (Schwinger et al. 2006).

Der große Vorteil der autologen HSZT ist die fehlende Gefahr einer GvHD mit nachfolgend notwendiger Immunsuppression, nachteilig jedoch gibt es auch praktisch keinen GvL-Effekt.

Für die Immunrekonstitution nach autologer HSZT ist dies dahingehend von Vorteil, dass sowohl die GvHD selbst als auch die nachfolgende Immunsuppression einen verzögernden Effekt auf die Immunrekonstitution haben, vor allem im frühen Stadium (Geddes et al. 2006, Uher et al. 2001). Diese Beobachtungen sprechen für einen Vorteil hinsichtlich der Geschwindigkeit der Immunrekonstitution in der Gruppe der autolog transplantierten Patienten.

Demgegenüber steht die Möglichkeit der Prävention der GvHD mittels CD34+ Selektionierung des PBSZ-Transplantats. Mehrere Studien haben gezeigt, dass mithilfe der CD34+ Selektionierung und damit konsekutiver T-Zell-Depletion die Häufigkeit einer GvHD signifikant gesenkt werden kann (Handgretinger et al. 2001, Lang et al. 2004).

In der oben genannten Publikation von Schwinger et al. wurden sowohl die allogenen als auch die autolog transplantierten PBSZ vor der Transplantation CD34+ selektioniert. In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen in beiden Gruppen sowohl CD34+ selektionierte als auch unselektionierte PBSZ verwendet.

Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Immunrekonstitution der T-Zellen bei allogener und autologer HSZT kann somit das unterschiedliche Studiendesign sein.

Hypothetisch betrachtet könnte die CD34+ Selektionierung bei Schwinger et al. zu einer verminderten Inzidenz von GvHD und somit zu einer relativ beschleunigten Immunrekonstitution in der Gruppe der allogenen transplantierten Patienten geführt haben. In der vorliegenden Arbeit jedoch könnte aufgrund der nur teilweise bestehenden CD34+ Selektionierung ein relativ häufigeres Auftreten von GvHD in der allogenen Gruppe vorliegen und somit die Gruppe der autolog transplantierten Patienten eine beschleunigte Immunrekonstitution aufweisen. Eine Homogenisierung der Gruppen hinsichtlich der CD34+ Selektionierung war in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da die Gruppen dann mit Patientenzahlen von 5 bzw. 6 Patienten zu klein für statistisch verlässliche Aussagen waren. Daten zur Inzidenz von GvHD liegen nicht vor.

In der Population der NK-Zellen und der zytotoxischen T-Zellen zeigt sich in der vorliegenden Arbeit ein Vorteil in der Gruppe der allogenen transplantierten Patienten gegenüber der autologen Gruppe. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen von Schwinger et al., auch hier war die Immunrekonstitution der NK-Zellen signifikant schneller in der allogenen Gruppe und die der zytotoxischen T-Zellen ohne statistische Signifikanz (Schwinger et al. 2006).

Die Population der NK-Zellen war zudem in beiden Gruppen bereits ab Tag 30 oberhalb der unteren Normgrenze.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der vorliegenden Arbeit die Immunrekonstitution in der Population der T-Helferzellen und der naiven TH-Zellen sowie bei der T-Zell-Ratio in der Gruppe der autolog transplantierten Patienten schneller verläuft als in der allogenen Gruppe. Grund hierfür könnte das fehlende Risiko einer GvHD sowie nachfolgend notwendiger Immunsuppression bei der autologen HSZT sein. Demgegenüber steht die schnellere Rekonstitution der NK- sowie der zytotoxischen T-Zellen in der allogenen Gruppe, was in ähnlicher Weise auch in anderen Forschungen gezeigt wurde (Schwinger et al. 2006).



### 6.1.3 Einfluss der CD34+ Selektionierung

Der dritte Vergleich der vorliegenden Arbeit geht der Frage nach, ob die Selektionierung der Stammzellen anhand der CD34 Oberflächenmarker einen signifikanten Einfluss auf die Immunrekonstitution nach HSZT hat.

Wie bereits oben erwähnt (s. Kap. 2.1 Grundzüge der Hämatopoese), ist der sog. CD34 der charakteristische Oberflächenmarker der pluripotenten Stammzelle, von welcher ausgehend sich alle weiter differenzierten Zelllinien der Hämatopoese entwickeln. Mithilfe immunomagnetischer Selektion können die zuvor mit Antikörpern markierten CD34+ Stammzellen aus dem Stammzellgemisch separiert werden (Bruhn et al. 2004).

Bei der autologen SZT verspricht man sich durch die CD34+ Selektionierung ein reineres Transplantat, das möglichst komplett frei von residuellen Tumorzellen ist, um dadurch ein Wiederauftreten der Grunderkrankung zu verhindern. Im Rahmen der allogenen Transplantation wird die Selektionierung zur T-Zell-Depletion genutzt, d.h. das Transplantat soll nahezu frei von reifen T-Lymphozyten sein und somit das Risiko einer GvHD möglichst gering (Archimbaud et al. 1995). Sie findet daher vor allem bei der haploidentischen Transplantation Verwendung.

Im Vergleich der Immunrekonstitution von CD34+ selektionierten und unselektionierten PBSZ zeigen sich in der vorliegenden Arbeit vor allem zu Beginn des beobachteten Zeitraums in den Populationen der T-, TH-, memory-TH- und der zytotoxischen T-Zellen signifikant höhere Zellzahlen in der unselektionierten Gruppe als in der Gruppe der CD34+ selektionierten Stammzellen. Im weiteren zeitlichen Verlauf kehrt sich das Verhältnis um und ab ca. ½ Jahr nach HSZT weist die CD34+ selektionierte Gruppe höhere Zellzahlen auf, statistisch signifikant ist dies jedoch nur in der Population der TH- und der naiven TH-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die Immunrekonstitution der T-Zellen nach CD34+ Selektionierung verzögert verläuft, ab ½ Jahr nach HSZT der Unterschied jedoch aufgehoben ist und sogar in der Gruppe der CD34+ selektionierten Stammzellen signifikant höhere Zellzahlen zu verzeichnen sind.

In der Population der B-Zellen ist der Verlauf genau umgekehrt, hier liegen die Werte der CD34+ selektionierten Gruppe zu Anfang über denjenigen der unselektionierten

Gruppe, ab ½ Jahr nach HSZT weist dann die Gruppe der unselektionierten PBSZ höhere Werte auf.

Bei den NK-Zellen lässt sich kein Unterschied in der Immunrekonstitution zwischen den beiden Gruppen feststellen, bereits ab Tag 30 nach HSZT liegen die Zellzahlen in beiden Gruppen über der unteren Normgrenze.

In der Literatur lassen sich hinsichtlich des Vergleichs von CD34+ selektionierten und unselektionierten Stammzellen ähnliche Ergebnisse finden. Mehrere Forschungsgruppen fanden einen nahezu gleichen Verlauf mit verzögerter Immunrekonstitution der T-Helferzellen bis ca. 6 Monate nach HSZT sowie keine signifikanten Unterschiede in der Rekonstitution von B- und NK-Zellen (Sica et al. 2001, Galy et al. 2000, Rutella et al. 2000, Martinez et al. 1999). Einzig die Population der CD8+ zytotoxischen T-Zellen zeigte in den o.g. Publikationen eine vergleichbare Rekonstitution ohne signifikante Unterschiede. Demgegenüber ergaben die Forschungen von Baron et al. ebenso eine verlangsamte Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen neben den T- und T-Helferzellen in der Gruppe der CD34+ selektionierten Stammzellen (Baron et al. 2003).

Der Grund für die verzögerte Immunrekonstitution innerhalb der T-Zellen sowie deren Subpopulationen nach CD34+ Selektionierung liegt in der Zusammensetzung des Transplantats. Während bei der Transplantation von unselektionierten PBSZ neben hämatopoetischen SZ auch reife und voll funktionsfähige Lymphozyten des Spenders übertragen werden, fehlen diese nach der CD34+ Selektionierung. Wie bereits oben erwähnt, sind genau diese reifen Lymphozyten unmittelbar nach HSZT maßgeblich an der Immunrekonstitution beteiligt, denn die Reifung neuer Zelllinien aus den pluripotenten Stammzellen dauert einige Zeit (Geddes et al. 2006).

Dies ist genau der Vorsprung, den die Gruppe der unselektionierten PBSZ zu Beginn des beobachteten Zeitraums hinsichtlich der signifikant höheren Zellzahlen in der Population der T-Zellen hat. Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigt sich jedoch, dass mit der Reifung neuer T-Lymphozyten die Gruppe der CD34+ selektionierten Stammzellen den Vorsprung einholt und zum Teil sogar signifikant höhere Werte aufweist als die unselektionierte Gruppe.

Von besonderem Interesse sind nun die klinischen Auswirkungen dieser Beobachtungen.

Im Rahmen der autologen SZT konnten Damiani et al. nachweisen, dass die verzögerte Immunrekonstitution nach CD34+ Selektionierung nicht mit einer erhöhten Inzidenz von Infektionen einhergeht (Damiani et al. 2003). In Bezug auf die Prävention eines Rückfalls der jeweiligen Grunderkrankung konnte bislang kein signifikanter Vorteil festgestellt werden. Die Forschungsergebnisse von Bourhis et al. und Stewart et al. zeigten keinen signifikanten Überlebensvorteil nach CD34+ Selektionierung trotz signifikanter Reduktion von residuellen Tumorzellen im Transplantat (Bourhis et al. 2007, Stewart et al. 2001).

Bei der allogenen HSZT zeigten die Ergebnisse mehrerer Forschungsgruppen eine insgesamt gute Immunrekonstitution mit niedriger Inzidenz von GvHD nach Transplantation von CD34+ selektionierten PBSZ (Eyrich et al. 2001, Finke et al. 1996). Auch hier fand sich trotz verzögerter Rekonstitution der T-Zellen keine erhöhte Inzidenz von Infektionen (Behringer et al. 1999).

Grund für die konstante Inzidenz von Infektionen trotz signifikant erniedrigter T-Zellzahlen unmittelbar nach HSZT ist die rasche und im Vergleich zur Transplantation von unselektionierten Stammzellen äquivalente Rekonstitution der NK-Zellen. Daneben spielen die NK-Zellen eine große Rolle für den GvL-Effekt, ohne GvHD auszulösen (Barrett et al. 2003, Ruggeri et al. 1999).

### **6.1.4 Einfluss der Konditionierung mit ATG**

Im vierten und letzten Vergleich der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob und inwiefern die Konditionierung mit ATG einen Einfluss auf die Immunrekonstitution nach HSZT hat.

ATG ist ein polyklonaler Antikörper gegen Lymphozyten. Er wird zum einen durch Injektion von humanen Thymozyten in Kaninchen oder zum anderen in Pferde gewonnen. Dabei ist das Kaninchen-ATG das in der Literatur am häufigsten verwendete ATG (Kaplan et al. 2012, Pezzutto et al. 2007).

ATG wirkt immunsuppressiv, indem es an eine Reihe von Oberflächenmarkern auf menschlichen Lymphozyten bindet und dadurch zum einen die Phagozytose durch Makrophagen, zum anderen auch direkt die Apoptose der Zielzelle induziert (Kaplan et al. 2012). Darüber hinaus induziert ATG regulatorische T-Zellen, die ihrerseits das Immunsystem supprimieren (Shimony et al. 2012).

Daher wird ATG vor allem zur Prävention von Abstoßungsreaktion und GvHD eingesetzt.

Die Indikation muss jedoch streng gestellt werden, denn neben den genannten und erwünschten Effekten hat die Anwendung von ATG auch ein großes Nebenwirkungsprofil. Da ATG tierischen Ursprungs ist, kann es zu allergischen bis hin zu anaphylaktischen Reaktionen kommen, bei Bildung von anti-ATG-Antikörpern auch zur Serumkrankheit. Des Weiteren hat die Immunsuppression das Risiko von Infektionen und lymphoproliferativer Erkrankung zur Folge (Pezzutto et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich im Vergleich der Immunrekonstitution ein statistisch signifikant verzögerter Verlauf in der Population der naiven TH-Zellen und der T-Zell-Ratio in der Gruppe der Patienten, die mit ATG behandelt wurden.

Bei den CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen weist die Gruppe ohne ATG über den gesamten beobachteten Zeitraum hinweg höhere absolute Zellzahlen auf als die Gruppe mit ATG, jedoch ohne statistische Signifikanz. Genau umgekehrt verhält es sich bei den CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen, hier liegt die Kurve der Gruppe mit ATG über derjenigen der Gruppe ohne ATG, hier ebenfalls nicht statistisch signifikant.

Die Verläufe der B-, T-, memory TH- und NK-Zellen zeigen keine Unterschiede in den beiden Gruppen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ATG eine verzögerte Rekonstitution innerhalb der naiven TH-Zellen, der T-Zell-Ratio und der T-Helferzellen bewirkt. Die Immunrekonstitution der CD8+ zytotoxischen Zellen ist dagegen in der Gruppe mit ATG schneller als in der Gruppe ohne ATG.

Scholl et al. konnten einen ähnlichen Effekt des ATG nachweisen, auch hier war die Rekonstitution der CD4+ T-Helferzellen durch ATG verzögert, wohingegen die CD8+ zytotoxischen T-Zellen in der Gruppe mit ATG eine bessere Immunrekonstitution zeigten (Scholl et al. 2005).

Auch die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen zeigten eine verlangsamte Rekonstitution der CD4+ T-Helferzellen nach Applikation von ATG (Schmidt-Hieber et al. 2010, Fehse et al. 2003, Nakai et al. 2003).

Grund für die spezifische Wirkung auf CD4+ T-Helferzellen könnte eine bevorzugte Bindung des ATG an CD4+ T-Zellen sein (Scholl et al. 2005).

Darüber hinaus haben mehrere Forschungsgruppen belegt, dass ATG über einen Zeitraum bis zu mehreren Monaten bindungsfähig im Körper zirkulieren kann, was den anhaltenden Effekt auf die Rekonstitution der T-Helferzellen erklärt (Kakhniashvili et al. 2005, Scholl et al. 2005). Die durchschnittliche Halbwertszeit des ATG wird mit 6,8 Tagen angegeben, bis es jedoch nicht mehr in therapeutischer Menge nachgewiesen werden kann, können bis zu 3 Monate vergehen (Kakhniashvili et al. 2005).

In Bezug auf die klinischen Folgen der genannten verzögernden Wirkung des ATG auf die Immunrekonstitution konnten Nakai et al. zeigen, dass die Inzidenz von GvHD nach Anwendung von ATG niedriger war als in der Vergleichsgruppe ohne ATG. Demgegenüber war die Infektionsrate in beiden Gruppen gleich (Nakai et al. 2003).

## 6.2 Methodische Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 80 Patienten der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der FSU Jena hinsichtlich der Immunrekonstitution nach HSZT verglichen. Dabei wurde in insgesamt vier Vergleichen jeweils ein Parameter auf seinen Einfluss auf die Immunrekonstitution hin untersucht. Aus statistischer Sicht wäre dafür eine vollständige Homogenität der zu vergleichenden Gruppen hinsichtlich anderer möglicher Einflussfaktoren zwingend notwendig.

Leider war die Einhaltung dieser Maßgabe in der vorliegenden Arbeit nicht immer möglich. So waren im ersten Vergleich die beiden Gruppen hinsichtlich der Transplantationsart homogen, die Verwendung von ATG konnte jedoch nicht berücksichtigt werden. Ähnlich sind die Bedingungen im zweiten Vergleich zu werten, auch hier sind zwar in beiden Gruppen nur HSZ zur Transplantation verwendet worden, eine weitere Differenzierung in Bezug auf die CD34+ Selektionierung konnte jedoch nicht durchgeführt werden. Auch im dritten Vergleich konnten die Gruppen nicht hinsichtlich der Transplantationsart homogenisiert werden. Einzig im letzten Vergleich waren beide Gruppen in Bezug auf mögliche andere Einflussfaktoren homogen.

Grund für die mangelnde Homogenisierung der zu vergleichenden Gruppen war die Patientenzahl. Diese war dann mit durchschnittlich 5-6 Patienten in einer Gruppe zu klein, um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

Es ist daher nicht auszuschließen, dass in der vorliegenden Arbeit in den genannten Vergleichen neben den untersuchten Parametern noch weitere Faktoren die Ergebnisse beeinflusst haben könnten.

Perspektivisch besteht die Möglichkeit einer weiterführenden Arbeit mit Aufbau auf die hier vorhandenen Messdaten und insgesamt höherer Patientenzahl, um einen reineren Vergleich und damit validere Ergebnisse zu erzielen.

## 7 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf die Immunrekonstitution nach HSZT im Kindesalter untersucht. Folgende Schlussfolgerungen lassen sich aus den Ergebnissen ziehen:

Die Stammzellquelle hat im Gegensatz zur HSZT im Erwachsenenalter keinen signifikanten Einfluss auf die Immunrekonstitution. Grund hierfür könnte die bei Kindern und Jugendlichen deutlich besser erhaltene Thymusfunktion sein, die einen wesentlichen Beitrag an der Reifung neuer Populationen von Lymphozyten (speziell T-Lymphozyten) hat.

Bei der allogenen HSZT verläuft die Immunrekonstitution innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen sowie der naiven TH-Zellen signifikant langsamer als bei der autologen Stammzelltransplantation. Als Ursache dafür könnte das Risiko einer GvHD mit nachfolgender immunsuppressiver Therapie bei der allogenen HSZT angesehen werden, da durch diese Komplikation der allogenen HSZT die Immunrekonstitution verzögert wird. Die Rekonstitution der NK- und der CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen wird hingegen bei der autologen HSZT langsamer beobachtet.

Durch die CD34<sup>+</sup> Selektionierung zeigt sich eine signifikant verzögerte Immunrekonstitution innerhalb der T-Zellen und deren Subpopulationen (T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen, naive und memory-TH-Zellen). Grund für diese Verzögerung könnte die nahezu vollständige T-Zell-Depletion im CD34<sup>+</sup> selektionierten Transplantat sein, denn die de-novo Reifung neuer T-Zelllinien aus den pluripotenten Stammzellen kann bis zu mehreren Monaten dauern.

Die Konditionierung mit ATG bewirkt eine signifikant langsamere Immunrekonstitution innerhalb der naiven TH-Zellen und der T-Zell-Ratio. Die Rekonstitution der CD4+ T-Helferzellen ist durch die Gabe von ATG im gesamten beobachteten Zeitraum verzögert, jedoch ohne statistische Signifikanz. ATG zirkuliert über mehrere Monate bindungsfähig im Körper und bindet bevorzugt an CD4+ Zellen, was eine Erklärung für die spezifische und andauernde Beeinflussung der T-Helfer und naiven TH-Zellen sein könnte.

Klinische Auswirkungen der genannten Ergebnisse wie die Inzidenz von GvHD oder Infektionsraten wurden in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst. Perspektivisch besteht die Möglichkeit weiterführender Studien, um die hier gefundenen Hypothesen weiter zu verifizieren und auf klinische Aspekte auszuweiten.



## 8 Literaturverzeichnis

- Archimbaud, E. (1997): Immune reconstitution following transplantation of selected hematopoietic stem cells. In: *Hematol Cell Ther* 39 (5), S. 264–268.
- Atkinson, K.; Farewell, V.; Storb, R.; Tsoi, M. S.; Sullivan, K. M.; Witherspoon, R. P. et al. (1982): Analysis of late infections after human bone marrow transplantation: role of genotypic nonidentity between marrow donor and recipient and of nonspecific suppressor cells in patients with chronic graft-versus-host disease. In: *Blood* 60 (3), S. 714–720.
- Baron, Frédéric; Schaaf-Lafontaine, Nicole; Humblet-Baron, Stéphanie; Meuris, Nathalie; Castermans, Emilie; Baudoux, Etienne et al. (2003): T-cell reconstitution after unmanipulated, CD8-depleted or CD34-selected nonmyeloablative peripheral blood stem-cell transplantation. In: *Transplantation* 76 (12), S. 1705–1713.
- Barrett, A. John; Rezvani, Katayoun; Solomon, Scott; Dickinson, Anne M.; Wang, Xiao N.; Stark, Gail et al. (2003): New developments in allotransplant immunology. In: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, S. 350–371.
- Bartsch, Hans Helge (1996): Knochenmark- und periphere Stammzelltransplantation. Medizinische Probleme der Posttransplantationsphase und Rehabilitationsstrategien ; 29 Tabellen. Basel: Karger (Tumorthherapie und Rehabilitation).
- Behringer, D.; Bertz, H.; Schmoor, C.; Berger, C.; Dwenger, A.; Finke, J. (1999): Quantitative lymphocyte subset reconstitution after allogeneic hematopoietic transplantation from matched related donors with CD34+ selected PBPC grafts unselected PBPC grafts or BM grafts. In: *Bone Marrow Transplant* 24 (3), S. 295–302.
- Bourhis, Jean-Henri; Bouko, Yasmina; Koscielny, Serge; Bakkus, Marleen; Greinix, Hildegard; Derigs, Gunter et al. (2007): Relapse risk after autologous transplantation in patients with newly diagnosed myeloma is not related with infused tumor cell load and the outcome is not improved by CD34+ cell selection: long term follow-up of an EBMT phase III randomized study. In: *Haematologica* 92 (8), S. 1083–1090.

- Bruhn, Hans D.; Ackermann, Sven (2004): Onkologische Therapie. Behandlung von Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren ; mit diagnostischen Hinweisen mit 145 Tabellen. Stuttgart: Schattauer.
- Cavazzana-Calvo, Marina; André-Schmutz, Isabelle; Dal Cortivo, Liliane; Neven, Bénédicte; Hacein-Bey-Abina, Salima; Fischer, Alain (2009): Immune reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation: obstacles and anticipated progress. In: *Curr. Opin. Immunol* 21 (5), S. 544–548.
- Comans-Bitter, W. M.; Groot, R. de; van den Beemd, R.; Neijens, H. J.; Hop, W. C.; Groeneveld, K. et al. (1997): Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. In: *J. Pediatr* 130 (3), S. 388–393.
- Damiani, D.; Stocchi, R.; Masolini, P.; Michelutti, A.; Geromin, A.; Sperotto, A. et al. (2003): CD34+-selected versus unmanipulated autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: impact on dendritic and immune recovery and on complications due to infection. In: *Ann. Oncol* 14 (3), S. 475–480.
- Eyrich, M.; Lang, P.; Lal, S.; Bader, P.; Handgretinger, R.; Klingebiel, T. et al. (2001): A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution in a paediatric cohort following transplantation of positively selected human leucocyte antigen-disparate haematopoietic stem cells from parental donors. In: *Br. J. Haematol* 114 (2), S. 422–432.
- Fehse, Natalja; Fehse, Boris; Kröger, Nicolaus; Zabelina, Tatjana; Freiburger, Petra; Krüger, William et al. (2003): Influence of anti-thymocyte globulin as part of the conditioning regimen on immune reconstitution following matched related bone marrow transplantation. In: *J. Hematother. Stem Cell Res* 12 (2), S. 237–242.
- Finke, J.; Brugger, W.; Bertz, H.; Behringer, D.; Kunzmann, R.; Weber-Nordt, R. M. et al. (1996): Allogeneic transplantation of positively selected peripheral blood CD34+ progenitor cells from matched related donors. In: *Bone Marrow Transplant* 18 (6), S. 1081–1086.
- Gadner, Helmut (2006): Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Mit 281 Tabellen. Heidelberg: Springer.
- Galy, A.; Rudraraju, S.; Baynes, R.; Klein, J. (2000): Recovery of lymphocyte and dendritic cell subsets after autologous CD34+ cell transplantation. In: *Bone Marrow Transplant* 25 (12), S. 1249–1255.
- Ganten, Detlev; Bähr, Mathias (2004): Molekularmedizinische Grundlagen von altersspezifischen Erkrankungen. Mit 67 Tabellen. Berlin: Springer (Molekulare Medizin).

- Gatti, R. A.; Meuwissen, H. J.; Allen, H. D.; Hong, R.; Good, R. A. (1968): Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. In: *Lancet* 2 (7583), S. 1366–1369.
- Geddes, Michelle; Storek, Jan (2007): Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. In: *Best Pract Res Clin Haematol* 20 (2), S. 329–348.
- Giannelli, Rossella; Bulleri, Maria; Menconi, Mariacristina; Casazza, Gabriella; Focosi, Daniele; Bernasconi, Sayla; Favre, Claudio (2012): Reconstitution rate of absolute CD8+ T lymphocyte counts affects overall survival after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: *J. Pediatr. Hematol. Oncol* 34 (1), S. 29–34.
- Glucksberg, H.; Storb, R.; Fefer, A.; Buckner, C. D.; Neiman, P. E.; Clift, R. A. et al. (1974): Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. In: *Transplantation* 18 (4), S. 295–304.
- Handgretinger, R.; Klingebiel, T.; Lang, P.; Schumm, M.; Neu, S.; Geiselhart, A. et al. (2001): Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. In: *Bone Marrow Transplant* 27 (8), S. 777–783.
- Hiddemann, Wolfgang; Huber, Heinz; Bartram, Claus R.: Die Onkologie. Berlin: Springer.
- Hoffbrand, Allan V. (2003): Grundkurs Hämatologie. Mit 123 Tabellen. 2., aktualisierte und erw. Berlin: Blackwell (Ex libris (Roche), 5).
- Ji, Shu-Quan; Chen, Hui-Ren; Wang, Hang-Xiang; Yan, Hong-Ming; Pan, Shi-Ping; Xun, Chang-Qing (2002): Comparison of outcome of allogeneic bone marrow transplantation with and without granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) donor-marrow priming in patients with chronic myelogenous leukemia. In: *Biol. Blood Marrow Transplant* 8 (5), S. 261–267.
- Kakhniashvili, Irina; Filicko, Joanne; Kraft, Walter K.; Flomenberg, Neal (2005): Heterogeneous clearance of antithymocyte globulin after CD34+-selected allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation. In: *Biol. Blood Marrow Transplant* 11 (8), S. 609–618.
- Kaplan, B.; Burkhart, G. J.; Lakkis, F. G. (2012): Immunotherapy in Transplantation: Principles and Practice: John Wiley & Sons Inc.

- Kiefel, Volker; Mueller-Eckhardt, Christian (2010): Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. Grundlagen - Therapie - Methodik. 4., überarb. und erw. Berlin: Springer.
- Koehne, G.; Zeller, W.; Stocksclaeder, M.; Zander, A. R. (1997): Phenotype of lymphocyte subsets after autologous peripheral blood stem cell transplantation. In: *Bone Marrow Transplant* 19 (2), S. 149–156.
- Lang, P.; Klingebiel, T.; Bader, P.; Greil, J.; Schumm, M.; Schlegel, P-G et al. (2004): Transplantation of highly purified peripheral-blood CD34+ progenitor cells from related and unrelated donors in children with nonmalignant diseases. In: *Bone Marrow Transplant* 33 (1), S. 25–32.
- Loiseau, Pascale; Busson, Marc; Balere, Marie-Lorraine; Dormoy, Anne; Bignon, Jean-Denis; Gagne, Katia et al. (2007): HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. In: *Biol. Blood Marrow Transplant* 13 (8), S. 965–974.
- Lorenz, E.; Congdon, C.; Uphoff, D. (1952): Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections. In: *Radiology* 58 (6), S. 863–877.
- Martínez, C.; Urbano-Ispizua, A.; Rozman, C.; Marín, P.; Rovira, M.; Sierra, J. et al. (1999): Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation: comparison of recipients of positive CD34+ selected grafts with recipients of unmanipulated grafts. In: *Exp. Hematol* 27 (3), S. 561–568.
- McCloskey, T. W.; Cavaliere, T.; Bakshi, S.; Harper, R.; Fagin, J.; Kohn, N.; Pahwa, S. (1997): Immunophenotyping of T lymphocytes by three-color flow cytometry in healthy newborns, children, and adults. In: *Clin. Immunol. Immunopathol* 84 (1), S. 46–55.
- Morton, J.; Hutchins, C.; Durrant, S. (2001): Granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF)-primed allogeneic bone marrow: significantly less graft-versus-host disease and comparable engraftment to G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells. In: *Blood* 98 (12), S. 3186–3191.
- Nakai, Kunihiisa; Mineishi, Shin; Kami, Masahiro; Saito, Takeshi; Hori, Akiko; Kojima, Rie et al. (2003): Antithymocyte globulin affects the occurrence of acute and chronic graft-versus-host disease after a reduced-intensity conditioning regimen by modulating mixed chimerism induction and immune reconstitution. In: *Transplantation* 75 (12), S. 2135–2143.

- Ochs, L.; Shu, X. O.; Miller, J.; Enright, H.; Wagner, J.; Filipovich, A. et al. (1995): Late infections after allogeneic bone marrow transplantations: comparison of incidence in related and unrelated donor transplant recipients. In: *Blood* 86 (10), S. 3979–3986.
- Ottinger, H. D.; Beelen, D. W.; Scheulen, B.; Schaefer, U. W.; Grosse-Wilde, H. (1996): Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. In: *Blood* 88 (7), S. 2775–2779.
- Petersen, Søren Lykke (2007): Alloreactivity as therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies. Studies of clinical and immunologic aspects of allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. In: *Dan Med Bull* 54 (2), S. 112–139.
- Pezzutto, Antonio; Ulrichs, Timo; Burmester, Gerd-Rüdiger (2007): Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen, Labor, Klinik. 2., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Ruggeri, L.; Capanni, M.; Casucci, M.; Volpi, I.; Tosti, A.; Perruccio, K. et al. (1999): Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. In: *Blood* 94 (1), S. 333–339.
- Russell, J. A.; Larratt, L.; Brown, C.; Turner, A. R.; Chaudhry, A.; Booth, K. et al. (1999): Allogeneic blood stem cell and bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia and myelodysplasia: influence of stem cell source on outcome. In: *Bone Marrow Transplant* 24 (11), S. 1177–1183.
- Rutella, S.; Rumi, C.; Laurenti, L.; Pierelli, L.; Sora', F.; Sica, S.; Leone, G. (2000): Immune reconstitution after transplantation of autologous peripheral CD34+ cells: analysis of predictive factors and comparison with unselected progenitor transplants. In: *Br. J. Haematol* 108 (1), S. 105–115.
- Schmidt-Hieber, Martin; Schwarck, S.; Stroux, A.; Ganepola, S.; Reinke, P.; Thiel, E. et al. (2010): Immune reconstitution and cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation: the important impact of in vivo T cell depletion. In: *Int. J. Hematol* 91 (5), S. 877–885.
- Scholl, S.; Mügge, L. O.; Issa, M. Charbel; Kasper, C.; Pachmann, K.; Höffken, K.; Sayer, H. G. (2005): Impact of early NK cell recovery on development of GvHD and CMV reactivation in dose-reduced regimen prior to allogeneic PBSCT. In: *Bone Marrow Transplant* 35 (2), S. 183–190.
- Schütt, Christine; Bröker, Barbara (2011): Grundwissen Immunologie. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum.

- Schwinger, Wolfgang; Weber-Mzell, Daniela; Zois, Birgit; Rojacher, Tanja; Benesch, Martin; Lackner, Herwig et al. (2006): Immune reconstitution after purified autologous and allogeneic blood stem cell transplantation compared with unmanipulated bone marrow transplantation in children.  
In: *Br. J. Haematol* 135 (1), S. 76–84.
- Seggewiss, Ruth; Einsele, Hermann (2010): Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update.  
In: *Blood* 115 (19), S. 3861–3868.
- Shimony, Orly; Nagler, Arnon; Gellman, Yechiel N.; Refaeli, Efrat; Rosenblum, Nir; Eshkar-Sebban, Lora et al. (2012): Anti-T Lymphocyte Globulin (ATG) Induces Generation of Regulatory T Cells, at Least Part of Them Express Activated CD44. In: *J. Clin. Immunol* 32 (1), S. 173–188.
- Sica, S.; Laurenti, L.; Sorà, F.; Menichella, G.; Rumi, C.; Leone, G.; Rutella, S. (2001): Immune reconstitution following transplantation of autologous peripheral CD34+ cells. In: *Acta Haematol* 105 (3), S. 179–187.
- Speer, Christian; Gahr, Manfred (2009): Pädiatrie. Mit 423 Tabellen. 3., vollst. neu bearb. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Stewart, A. K.; Vescio, R.; Schiller, G.; Ballester, O.; Noga, S.; Rugo, H. et al. (2001): Purging of autologous peripheral-blood stem cells using CD34 selection does not improve overall or progression-free survival after high-dose chemotherapy for multiple myeloma: results of a multicenter randomized controlled trial.  
In: *J. Clin. Oncol* 19 (17), S. 3771–3779.
- Storek, J.; Dawson, M. A.; Storer, B.; Stevens-Ayers, T.; Maloney, D. G.; Marr, K. A. et al. (2001): Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. In: *Blood* 97 (11), S. 3380–3389.
- Uher, F.; Puskás, E.; Torbágyi, E.; Barta, A.; Kormos, L.; Pálóczi, K. (2001): [Regeneration of the immune system after bone marrow transplantation] Az immunrendszer regenerációja csontvelő-átültetés után. In: *Orv Hetil* 142 (2), S. 59–65.
- Wagner, John E.; Gluckman, Eliane (2010): Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years. In: *Semin. Hematol* 47 (1), S. 3–12.

## 9 Anhang

### 9.1 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Übersicht über die relevanten Zellpopulationen des lymphatischen Systems
- Tabelle 2: Übersicht über die nötige Dosis der verschiedenen Stammzellquellen
- Tabelle 3: Übersicht über die Genloci der zwei MHC Klassen
- Tabelle 4: Zeitlicher Ablauf der Stammzelltransplantation
- Tabelle 5: Stadieneinteilung der akuten GvHD nach Organmanifestation
- Tabelle 6: Patientencharakteristika
- Tabelle 7: Konditionierung der Patienten
- Tabelle 8: Liste der verwendeten Antikörper inkl. Farbstoffe und Hersteller
- Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Hersteller
- Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Geräte und Hersteller
- Tabelle 11: Übersicht über die analysierten Zellpopulationen
- Tabelle 12: Untere Normwerte der Zellpopulationen für Kinder im Alter von 10-16 Jahren
- Tabelle 13: Übersicht über die statistisch signifikanten Unterschiede mit p-Wert (Wilcoxon-Mann-Whitney) im Vergleich der Immunrekonstitution nach Transplantation von KM und PBSZ
- Tabelle 14: Übersicht über die statistisch signifikanten Unterschiede mit p-Wert (Wilcoxon-Mann-Whitney) im Vergleich der Immunrekonstitution nach autologer und allogener Transplantation
- Tabelle 15: Übersicht über die statistisch signifikanten Unterschiede mit p-Wert (Wilcoxon-Mann-Whitney) im Vergleich der Immunrekonstitution nach Transplantation von CD34+ selektionierten und unselektionierten PBSZ
- Tabelle 16: Übersicht über die statistisch signifikanten Unterschiede mit p-Wert (Wilcoxon-Mann-Whitney) im Vergleich der Immunrekonstitution nach Transplantation von KM mit und ohne Konditionierung durch ATG

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Übersicht über die Hämatopoese
Abbildung 2:	Die Genloci des HLA-Komplexes auf Chromosom 6
Abbildung 3:	Grunderkrankungen der Patienten
Abbildung 4:	Immunrekonstitution der B-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ
Abbildung 5:	Immunrekonstitution der B-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ (Darstellung nur bis Tag 60)
Abbildung 6:	Immunrekonstitution der T-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ
Abbildung 7:	Immunrekonstitution der TH-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ
Abbildung 8:	Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ
Abbildung 9:	Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ (Darstellung nur bis Tag 60)
Abbildung 10:	Immunrekonstitution der naiven TH-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ
Abbildung 11:	Immunrekonstitution der memory TH-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ
Abbildung 12:	Immunrekonstitution der NK-Zellen nach Transplantation von KM versus PBSZ
Abbildung 13:	Immunrekonstitution der T-Zell-Ratio nach Transplantation von KM versus PBSZ
Abbildung 14:	Immunrekonstitution der B-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation
Abbildung 15:	Immunrekonstitution der T-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation
Abbildung 16:	Immunrekonstitution der TH-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation
Abbildung 17:	Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation



- Abbildung 18: Immunrekonstitution der naiven TH-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation
- Abbildung 19: Immunrekonstitution der memory TH-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation
- Abbildung 20: Immunrekonstitution der NK-Zellen nach autologer versus allogener Transplantation
- Abbildung 21: Immunrekonstitution der T-Zell-Ratio nach autologer versus allogener Transplantation
- Abbildung 22: Immunrekonstitution der B-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ
- Abbildung 23: Immunrekonstitution der T-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ
- Abbildung 24: Immunrekonstitution der T-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ (Darstellung nur bis Tag 100)
- Abbildung 25: Immunrekonstitution der TH-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ
- Abbildung 26: Immunrekonstitution der TH-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ (Darstellung nur bis Tag 100)
- Abbildung 27: Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ
- Abbildung 28: Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ (Darstellung nur bis Tag 100)
- Abbildung 29: Immunrekonstitution der naiven TH-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ
- Abbildung 30: Immunrekonstitution der memory TH-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ
- Abbildung 31: Immunrekonstitution der memory TH-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ (Darstellung nur bis Tag 100)

- Abbildung 32: Immunrekonstitution der NK-Zellen nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ
- Abbildung 33: Immunrekonstitution der T-Zell-Ratio nach Transplantation von CD34+ selektionierten versus unselektionierten PBSZ
- Abbildung 34: Immunrekonstitution der B-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG
- Abbildung 35: Immunrekonstitution der T-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG
- Abbildung 36: Immunrekonstitution der TH-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG
- Abbildung 37: Immunrekonstitution der zytotoxischen T-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG
- Abbildung 38: Immunrekonstitution der naiven TH-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG
- Abbildung 39: Immunrekonstitution der memory TH-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG
- Abbildung 40: Immunrekonstitution der NK-Zellen nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG
- Abbildung 41: Immunrekonstitution der T-Zell-Ratio nach Transplantation von KM mit Konditionierung durch ATG versus KM ohne Konditionierung durch ATG

## 9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- PD Dr. B. Gruhn (Leiter Sektion Hämatologie/Onkologie, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Jena)
- Dr. R. Häfer (Hämatologisches Labor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Jena)
- Frau I. Wolff (Medizinische Dokumentation, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Jena)
- Prof. Dr. Peter Schlattmann (Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation)

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Halle, den

.....

Marie-Luise Pietschmann

## 9.5 Danksagung

Hiermit möchte ich allen Menschen meinen ausdrücklichen und herzlichen Dank aussprechen, ohne deren tatkräftige Unterstützung die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle danke ich vor allem **Herrn PD Dr. B. Gruhn** für die freundliche Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung während jeder Phase der Entstehung der vorliegenden Dissertation. Seine stetige Motivationshilfe und konstruktive Kritik haben einen entscheidenden Anteil zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Großer Dank gilt **Herrn Dr. R. Häfer** für die geduldige und freundliche Einweisung in die technischen Abläufe der Durchflusszytometrie sowie die tatkräftige Hilfe bei der Auswertung und Interpretation der Messergebnisse.

**Frau I. Wolff** gebührt Dank für die freundliche Bereitstellung der Patientendaten sowie für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ohne die mentale und finanzielle Unterstützung **meiner Eltern** wäre das Erstellen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen, vielen Dank vor allem auch für die unermüdlichen Motivationshilfen.

Mein besonderer Dank gilt **meinem Bruder Georg**, der mir durch seine fleißige und mühevolle Hilfe über einige für mich unüberwindliche Hürden bei der Datenauswertung und –Verwaltung hinweggeholfen hat.

Auch bei meinen unersetzlichen **Freunden** möchte ich mich für die stetige Unterstützung und Motivation bedanken, vor allem **Robert** gebührt großer Dank für die konstruktive Kritik und Korrektur.